



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2011

**Ana Rita Manso  
Carvalho Tavares**

**Pesquisa de IgE antitoxinas de *S. aureus* em doentes  
e portadores**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
2011

**Ana Rita Manso  
Carvalho Tavares**

## **Pesquisa de IgE antitoxinas de *S. aureus* em doentes e portadores**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz, Professora Associada no Departamento de Química da Universidade da Beira Interior e coorientação científica da Prof. Doutora Maria Adelaide Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, cunhada e namorado pelo incansável apoio. E em especial à minha sobrinha Mafalda pela vitalidade que trouxe à minha vida.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

**Mestre Ana Carina Marques dos Santos**

Professora Assistente da Escola Superior de Tecnologias da Saúde Drº Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco

orientador

**Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz**

Professora Associada no Departamento de Química da Universidade da Beira Interior

coorientador

**Prof. Doutora Maria Adelaide Pinho Almeida**

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Ao Dr. Paulo Manuel Tavares Beja Ratado, o verdadeiro impulsionador deste trabalho, obrigada pela paciência, pelos bons conselhos, pelas ideias inovadoras e por facilitar o meu trabalho dentro do laboratório.

À minha coorientadora Prof. Doutora Maria Adelaide Pinho Almeida, pela simpatia, pela disponibilidade em ajudar e pelos conselhos.

Ao Prof. Doutor António Correia e Prof. Doutora Sónia Mendo, pela disponibilidade demonstrada em esclarecer dúvidas, dar bons conselhos e facilitar a realização deste Mestrado.

A toda a equipa do laboratório, em especial ao setor de Microbiologia, à Carina, Dr<sup>a</sup> Patrícia, Graça, Dr<sup>a</sup> Fátima e auxiliares de ação médica. Obrigada por tudo! Sem o vosso apoio seria bem mais difícil.

A todos os meus amigos que sempre estiveram do meu lado, em especial à Carolina e à Dora, obrigada pela preciosa ajuda.

À minha família: pais, irmãos e cunhada por todo apoio incondicional, confiança, paciência e amor transmitidos.

Ao Miguel pelo amor, incentivo, encorajamento, paciência e força nos momentos mais difíceis. Obrigada por fazeres parte da minha vida!

A todos aqueles que fizeram deste trabalho uma realidade...

## palavras-chave

*S. aureus*, Atopia, IgE, Enterotoxinas, MRSA

## resumo

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo versátil e patogénico para o Homem. A frequência de infeções estafilocócicas adquiridas na comunidade e em meio hospitalar têm aumentado significativamente ao longo do tempo, devido aos mecanismos que o microrganismo desenvolveu para escapar às defesas do hospedeiro, nomeadamente a produção de um conjunto de enterotoxinas, com atividade de superantígenos. A atividade destas toxinas não se baseia apenas em mecanismos tóxicos, mas também na produção de imunoglobulina E (IgE) tanto em indivíduos atópicos, como em não atópicos, agravando a severidade da doença.

Este trabalho teve como objetivos: 1) determinar a concentração de IgE específica para uma mistura de alérgenos inalantes (*Phadiatop*) em doentes com infeção por *S. aureus* e em portadores; 2) determinar a concentração de IgE específica antienterotoxinas em doentes e portadores atópicos e não atópicos; 3) identificar as toxinas produzidas pelo *S. aureus* em doentes e portadores atópicos e não atópicos.

A recolha das amostras foi efetuada em diversos serviços do Hospital Sousa Martins da Guarda no período de janeiro de 2011 a setembro de 2011. A determinação do *Phadiatop* e concentração da IgE específica antienterotoxinas foi efetuada no sistema automatizado ImmunoCAP® 250 Phadia e a identificação das toxinas produzidas foi realizada com o Kit SET-RPLA e TST-RPLA Oxoid.

Os resultados mostraram que a toxina prevalente nos doentes é a SEC, enquanto que nos portadores é a SEA. Relativamente à concentração de IgE específica antienterotoxinas, verificou-se que a IgE antienterotoxina A é significativamente inferior nos doentes, quando comparada com os portadores. Os doentes e portadores não atópicos apresentam concentrações de IgE específica antienterotoxinas A e TSST-1 significativamente mais baixas do que doentes e portadores atópicos, o que indica que indivíduos não atópicos necessitam de uma forte estimulação antigénica para desencadear uma resposta imunitária mediada por IgE. Assim, conclui-se que a atopia é um fator que predispõe para a produção de anticorpos do tipo IgE antienterotoxinas.

**keywords**

*S. aureus*, Atopy, IgE, Enterotoxins, MRSA

**abstract**

*Staphylococcus aureus* is a versatile and pathogenic microorganism to humans. The frequency of staphylococcal infections acquired both in the community and in hospitals has increased significantly over the time due to the development of mechanisms by the microorganisms to evade host defenses, such as the production of a set of enterotoxins with superantigen activity. The activity of these toxins is not based only on toxic mechanisms, but also in the production of immunoglobulin E (IgE), both in atopic and in nonatopic subjects, what increases the severity of the disease.

The objective of this work was: 1) to determine the production of specific IgE to a mixture of inhalant allergens (Phadiatop) in patients infected with *S. aureus* and carriers; 2) to determine the production of specific IgE antienterotoxin in atopic and non atopic patients and carriers; 3) to identify the toxins produced by *S. aureus* in atopic and non atopic patients and carriers

The collection of the samples was carried out in various departments of the Hospital Sousa Martins, Guarda from January 2011 to September 2011. The concentration of Phadiatop and specific IgE antitoxins was determined using the automated system Phadia ImmunoCAP® 250 and toxin production was determined with the Oxoid kit SET-RPLA and TST-RPLA.

The results showed that the toxin more prevalent in patients is the SEC, while in carriers is the SEA. In relation to the concentration of specific IgE antienterotoxin, it was found that IgE antienterotoxin A is significantly lower in patients than in carriers. Non-atopic patients and carriers have specific IgE concentrations of antienterotoxin A and TSST-1 significantly lower than atopic patients and carriers, indicating that non-atopic individuals need a strong antigenic stimulation to trigger an immune response mediated by IgE. Thus, it is concluded that atopy is a predisposing factor for the production of antibodies to IgE antienterotoxin.

# Índice

I - Introdução .....	i
1.1 Introdução .....	2
1.2 Epidemiologia do género <i>Staphylococcus</i> .....	3
1.3 Características morfológicas e culturais .....	4
1.4 Mecanismos estruturais de patogenicidade .....	4
1.4.1 Peptidoglicano .....	5
1.4.2 Proteína A .....	5
1.4.3 Ácidos Teicóicos .....	6
1.5 Produção de substâncias extracelulares .....	6
1.5.1 Toxinas .....	6
1.5.1.1 Toxina alfa ( $\alpha$ ) .....	7
1.5.1.2 Toxina beta ( $\beta$ ) .....	7
1.5.1.3 Toxina delta ( $\delta$ ) .....	7
1.5.1.4 Toxina gama ( $\gamma$ ) .....	8
1.5.1.5 Leucocidina .....	8
1.5.1.6 Toxinas exfoliativas .....	8
1.5.1.7 Toxina do síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) .....	9
1.5.1.8 Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) .....	9
1.5.2 Enzimas .....	11
1.5.2.1 Coagulase .....	11
1.5.2.2 Catalase .....	12
1.5.2.3 Hialuronidase .....	12
1.5.2.4 Fibrinolisinase .....	12
1.5.2.5 Lipases .....	12
1.5.3.6 Beta lactamase ( $\beta$ lactamase) .....	13
1.5.3 Outros fatores de virulência .....	13
1.6 Patologias associadas ao <i>S. aureus</i> .....	14
1.6.1 Intoxicação alimentar .....	15



---

1.6.2 Síndrome do Choque Tóxico (TSS) .....	16
1.6.3 Endocardite .....	17
1.6.4 Bacteremia .....	17
1.7.1 Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	18
1.8 MRSA em Profissionais de Saúde .....	19
1.9 MRSA do hospital para a comunidade .....	20
1.10 <i>S. aureus</i> e Doença Alérgica .....	22
1.10.1 Sistema Imunitário e Resposta Imunológica .....	22
1.10.2 Imunoglobulina E .....	24
1.10.3 Reações de hipersensibilidade/ Doença alérgica .....	25
1.10.4 <i>S. aureus</i> e atopia .....	27
1.10.4.1 Portador nasal de <i>S. aureus</i> e a sua relação com atopia .....	28
1.10.4.2 Doentes com infeção por <i>S. aureus</i> e a sua relação com atopia .....	29
1.11 Objetivos .....	30
II - Material e Métodos .....	31
2.1 Local e Período do Estudo .....	32
2.2 Amostra .....	32
2.2.1 Indivíduos doentes .....	32
2.2.2 Portadores .....	32
2.3 Critérios de seleção das amostras biológicas .....	33
2.4 Colheita das amostras biológicas .....	33
2.4.1 Exsudado nasal .....	33
2.4.2 Colheita de sangue .....	33
2.5 Processamento das amostras .....	34
2.6 Caracterização fenotípica .....	34
2.7 Identificação dos isolados bacterianos .....	35
2.7.1 Identificação de <i>S. aureus</i> .....	35
2.7.2 Prova da Catalase .....	35
2.7.3 Identificação de MRSA .....	36
2.7.4 Coloração de Gram .....	37
2.8 Produção de toxinas estafilocócicas .....	38

---

2.8.1 Detecção de enterotoxinas A, B, C e D.....	38
2.8.2 Detecção de TSST-1.....	39
2.9 Determinação de IgE específica para uma mistura de alérgenos inalantes, IgE total e IgE antienterotoxinas .....	40
2.9.1 Determinação de IgE específica para uma mistura de alérgenos inalantes ( <i>Phadiatop</i> ®) .....	40
2.9.2 Determinação de IgE Total .....	41
2.9.3 Determinação de IgE específica anti-SE .....	41
2.10 Tratamento Estatístico .....	42
III - Resultados e Discussão .....	44
3.1 Caracterização da amostra .....	45
3.2 Produção de toxinas em doentes e em portadores.....	50
3.3 Produção de IgE específica antienterotoxinas em doentes e profissionais de saúde .....	54
3.4 Produção de toxinas e de IgE específica antienterotoxinas nos doentes e portadores .....	61
3.5 Identificação de indivíduos atópicos e não atópicos .....	63
3.6 Produção de IgE específica antienterotoxinas em indivíduos atópicos e não atópicos .....	63
3.7 Produção de toxinas e IgE específica antienterotoxinas em função do sexo, em doentes e profissionais de saúde .....	65
IV - Conclusão .....	67
4.1 Conclusão .....	68
V - Perspetivas Futuras .....	70
5.1 Perspetivas Futuras.....	71
VI - Bibliografia .....	72

## Lista de figuras

Figura 1.1 – Estrutura da parede celular do *Staphylococcus*

Figura 1.2- Diferenças entre antigénios e superantigénios

Figura 1.3 – Prevalência de MRSA a nível Europeu no ano de 2008

Figura 1.4 – Estrutura molecular de uma imunoglobulina

Figura 3.1 – Elementos da amostra segundo o sexo

Figura 3.2 – Elementos da amostra segundo o grupo etário

Figura 3.3 – Elementos da amostra segundo o serviço

Figura 3.4 – Profissionais de saúde segundo o facto de serem, ou não, portadores de MRSA

Figura 3.5 - Produção de toxinas do *S. aureus* em doentes e em portadores de MRSA

Figura 3.6 - Distribuição da percentagem de indivíduos sensibilizados às diferentes enterotoxinas de *S.aureus*

Figura 3.7 – Prevalência da produção de toxinas e de IgE específica anti-SE em função do produto biológico em doentes

Figura 3.8 - Prevalência da produção de toxinas e de IgE específica anti-SE em função do serviço em portadores de MRSA

## Lista de tabelas

Tabela 2.1 – Interpretação de resultados segundo o facto de ser portador ou não MRSA

Tabela 2.2 – Concentração de IgE específica e estratificação do grau de risco de anafilaxia

Tabela 3.1- Elementos da amostra segundo o produto biológico

Tabela 3.2 – Elementos da amostra segundo a concentração de IgE total e IgE específica anti-SE do *S. aureus*

Tabela 3.3 – Prevalência da produção de toxinas e de IgE específica anti-SE em função do produto biológico em doentes

Tabela 3.4 – Prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em função do serviço em portadores de MRSA

Tabela 3.5 – – Produtores de toxinas *versus* produtores de IgE específica anti-SE

Tabela 3.6 – Caracterização da amostra segundo a atopia

Tabela 3.7 – Indivíduos atópicos e não atópicos produtores de IgE específica anti-SE

Tabela 3.8 – *S. aureus* produtores de toxinas em função do sexo

Tabela 3.9 – Produtores de IgE específica anti-SE em função do sexo

## Lista de abreviaturas

*agr* – gene regulador acessório

APC – Células apresentadoras de antígenos

ARS – Asma Refrataria Severa

CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente associado à comunidade

COS - Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro

DA – Dermatite Atópica

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EPS – Substâncias poliméricas extracelulares

Ig – Imunoglobulinas

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucinas

LPS - Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MSA2 - Gelose Chapman 2

MSCRAMMS – *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

NaCl – Cloreto de sódio

PBP2a – Proteína de ligação à penicilina

RI – Rinite Alérgica

SE – Enterotoxinas estafilocócicas

SI – Sistema Imunitário

SPSS - *Statistical Package for the Social Science*

TCR – Recetor de células T

Th1 – T *helper* 1

Th2 – T *helper* 2

TNF – Fator de necrose tumoral

TSS – Síndrome do choque tóxico

TSST-1 – Toxina do Síndrome do Choque Tóxico-1

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

## **I - Introdução**

## 1.1 Introdução

Numa série de observações clínicas e estudos laboratoriais publicados entre 1880 e 1882, Ogston descreveu a doença estafilocócica e o seu envolvimento em múltiplas patologias, nomeadamente a sepsis, formação de abcessos, infeções de pele entre outras (Ogston, 1882; Lowy, 1998). Mais de 100 anos depois, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tornou-se versátil e patogénico para o homem, confirmando os estudos de Ogston. A frequência de infeções estafilocócicas, tanto as adquiridas na comunidade, como em meio hospitalar, tem aumentado significativamente ao longo do tempo continuando assim, a suscitar o interesse de vários investigadores (DeVries, *et al.*, 2011; Lamy, *et al.*, 2011; Lee, *et al.*, 2011).

Este microrganismo desenvolveu um conjunto de defesas que lhe permitem escapar às defesas do hospedeiro, nomeadamente, a produção de um conjunto de enterotoxinas, desenvolvendo assim, uma elevada facilidade de colonização e resistência à antibioterapia. A atividade destas enterotoxinas baseia-se, não só em mecanismos tóxicos como também, na produção de Imunoglobulina E (IgE) específica antienterotoxinas, agravando a severidade da doença (Aalberse, 2000).

Alguns estudos mostram que a produção de IgE específica antienterotoxinas de *S. aureus* está relacionada com várias patologias, como a dermatite atópica (DA), doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), asma refractária severa (ARS), rinite alérgica (RA) e pólipos nasais. Estes doentes são vetores importantes na transmissão da bactéria na comunidade, tornando-se importante o despiste de colonização por *S. aureus* (Barbier, *et al.*, 2010; Kowalski, *et al.*, 2011).

A escolha deste tema deve-se ao facto de não existirem estudos em Portugal que comparem a produção de enterotoxinas e IgE específicas antienterotoxinas de *S. aureus*, em doentes e em portadores e ao facto de não se saber se a produção de IgE específicas antienterotoxinas está associada à atopia nestes dois grupos.



## 1.2 Epidemiologia do género *Staphylococcus*

O termo *Staphylococcus* foi usado pela primeira vez por Ogston em 1883 para designar cocos dispostos em cacho, responsáveis por abscessos no homem e animais. Posteriormente, Rosenbach admitiu o género *Staphylococcus*, que pertence à família *Micrococcaceae*.

*Staphylococcus* vive em contacto íntimo com o homem, numa relação habitual de comensalismo ou mutualismo. Muitas espécies constituem parte importante da população microbiana indígena da pele e mucosas. No entanto, o género inclui também alguns dos principais microrganismos patogénicos, nomeadamente a espécie *Staphylococcus aureus* (Ferreira e Sousa, 2000). *S. aureus* foi reconhecido há mais de 100 anos como o microrganismo patogénico mais importante para o homem. A epidemiologia das infeções estafilocócicas deve começar com o estudo do seu habitat. Nos humanos é frequentemente isolado nas narinas, orofaringe, pele, axilas e períneo (Silva e Neufeld, 2006; Mahon, *et al.*, 2007).

Quando a relação de equilíbrio entre microrganismo e hospedeiro é afetada, ou quando o microrganismo tem acesso a locais habitualmente estéreis devido à quebra de barreiras, pode causar infeção endógena. Para além deste tipo de infeção, pode ocorrer infeção cruzada a partir de outra pessoa por contacto direto ou indireto, através de objetos e superfícies contaminadas e ainda, por via aérea (Walker, *et al.*, 2007).

O reservatório principal de *S. aureus* é a cavidade nasal (Cristino, 2000). Assim, a colonização nasal ocorre em aproximadamente 30% dos adultos saudáveis, contudo são verificados níveis de colonização acima dos 50% em determinados grupos, como os utilizadores de drogas intravenosas, diabéticos, doentes com cateteres, com doenças dermatológicas ou em profissionais de saúde. A colonização nasal é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infeção. Uma vez assintomática, apresenta grande importância clínica, pois a colonização das narinas leva à contaminação das mãos veiculando a transmissão da bactéria. Esta situação suscita especial interesse a nível hospitalar, onde mais de 40% dos profissionais de saúde são portadores (Davis, 2005; Paule, *et al.*, 2007).

A colonização é o passo principal na patogenia da infeção por *S. aureus* e é fulcral na epidemiologia nosocomial desta bactéria. Ser portador nasal é um fator de risco para a

aquisição de uma infecção nosocomial. Um estudo desenvolvido por Tang e Stratton (2010), mostra que, 80% dos episódios de bacteremia nosocomial nos portadores de *S. aureus* tiveram origem endógena e são três vezes mais frequentes nos portadores do que em não portadores (Tang e Stratton, 2010).

### 1.3 Características morfológicas e culturais

*S. aureus* é um coco Gram positivo, com aproximadamente 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, não esporulado, imóvel e capsulado. No exame direto após coloração de Gram, agrupa-se caracteristicamente em cacho, embora também possa aparecer isolado ou aos pares, é um aeróbio facultativo (Madigan, *et al.*, 2009). É facilmente cultivável “*in vitro*”, desenvolvendo-se bem em meios de cultura pouco nutritivos. Após 24 horas de incubação a 37°C, em gelose de sangue, forma colônias redondas de 2 a 3 mm de diâmetro, de cor variável entre o branco e o dourado, com bordo regular, um pouco convexas, brilhantes, lisas e opacas. A tonalidade dourada deve-se à presença de um pigmento denominado carotenoide. Neste meio, é em geral observada uma zona de hemólise a envolver a colônia, devido à produção de hemolisinas. Em certas infecções crônicas (endocardites, osteomielites) o isolamento pode dar origem a microcolônias, em vez da morfologia normal. Este microrganismo desenvolve-se bem em meio de Chapman (ou meio manitol salgado), fermentando o manitol. O meio contém cloreto de sódio (NaCl) o que o torna altamente seletivo, mostrando a resistência do *S. aureus* a elevadas concentrações de NaCl (Kanafani e Vance, 2006; Murray, 2006; Pádua, 2009).

### 1.4 Mecanismos estruturais de patogenicidade

A parede celular, limitada no interior pela membrana citoplasmática e no exterior pela cápsula, é o componente estrutural mais relevante do *S. aureus*. É constituída pelo peptidoglicano, pela proteína A e ácidos teicóicos (Figura 1.1) (Cristino, 2000).

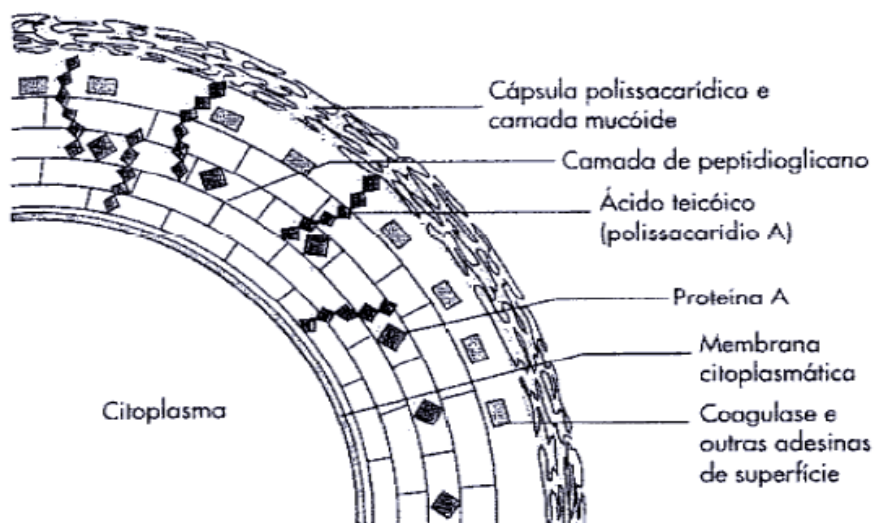


Figura 1.1- Estrutura da parede celular dos *Staphylococcus* (adaptado de Murray 2006)

### 1.4.1 Peptidoglicano

É o principal componente estrutural da parede celular, responsável pela estabilidade osmótica de *Staphylococcus*. A camada de peptidoglicano é composta por cadeias cruzadas de glicano e peptídeos. Pode ter atividade endotóxica, estimulando a produção de citocinas através de macrófagos, ativação do complemento e a agregação de plaquetas. A lisozima presente nas lágrimas, saliva, leucócitos, monócitos e macrófagos pode hidrolisar a ligação das subunidades de glicano e assim, formar uma barreira natural à infecção por *Staphylococcus* (Lowy, 1998; Murray, 2006).

### 1.4.2 Proteína A

É uma proteína que envolve o exterior do peptidoglicano na espécie *S. aureus*. Tem a capacidade de se ligar à região Fc das IgG1, IgG2, e IgG4, exercendo um efeito antifagocítico e em reações de hipersensibilidade, onde promove a liberação de histamina. Para além disto, é capaz também de gerar imunocomplexos que levam ao consumo do

complemento, devido às ligações que formam com anticorpos (Murray, 2006, Santos, *et al.*, 2007; Schaechter, 2009).

### **1.4.3 Ácidos Teicóicos**

Os ácidos teicóicos são moléculas complexas, de natureza polissacarídica, que se ligam tanto ao peptidoglicano, como à membrana citoplasmática. A sua composição é específica de espécie. Em *S. aureus* é característico o ácido ribitol teicóico (Qian, *et al.*, 2006).

Estes componentes são antigénicos, levando à produção de anticorpos e permitem ao *Staphylococcus*, ligar-se à fribronectina presente na superfície das mucosas (Cristino, 2000, Murray, 2006; Schaechter, 2009).

Para além da parede celular, a cápsula é também uma estrutura importante. Constituída por lipopolissacarídeo (LPS) que habitualmente não se revela quando o microrganismo é cultivado *in vitro*. Contudo, pensa-se que, quando surge *in vitro*, tem um papel relevante como agente antifagocitário (Cristino, 2000; Murray, 2006; Schaechter, 2009).

## **1.5 Produção de substâncias extracelulares**

Além dos mecanismos de patogenicidade estruturais, existem outros como a produção de substâncias extracelulares, onde se encontram incluídas as enzimas e toxinas (Tortora, *et al.*, 2010).

### **1.5.1 Toxinas**

*S. aureus* produz numerosas toxinas que são agrupadas de acordo com o seu mecanismo de ação, levando à indução de uma resposta imune e, conseqüentemente, a manifestações clínicas características do processo infeccioso que determinará o grau de severidade dos sintomas (Murray, 2006; Nuñez, *et al.*, 2008).

Neste conjunto de toxinas, incluem-se pelo menos cinco toxinas citolíticas: alfa, beta, delta, gama e leucocidina. As primeiras quatro são também denominadas de hemolisinas, devido à sua capacidade de lisar os eritrócitos. Para além deste conjunto, pode produzir também uma toxina esfoliativa, toxina do síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) e nove enterotoxinas estafilocócicas (SE). Este conjunto de toxinas tem capacidade de lisar os neutrófilos provocando a libertação da enzima lisossomal que danifica os tecidos circundantes (Foster, 2004; Murray, 2006; Schaechter, 2009).

#### **1.5.1.1 Toxina alfa ( $\alpha$ )**

Segundo Murray (2006) esta toxina é citotóxica para um grande número de células, entre os quais eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hepatócitos e fibroblastos humanos, apresentando também a capacidade de alterar a integridade do músculo liso da parede dos vasos sanguíneos (Murray, 2006). No entanto, a função primordial da toxina  $\alpha$  é a formação de poros, induzindo mudanças pró-inflamatórias nas células. Este dano celular pode contribuir por exemplo, para a sepsis (Lowy, 1998).

#### **1.5.1.2 Toxina beta ( $\beta$ )**

É uma toxina termolábil e tóxica para uma grande variedade de células, incluindo eritrócitos, leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Esta enzima tem especificidade para a esfingomielina, podendo destruir tecidos e formar abscessos. É também responsável pela habilidade de *S. aureus* em proliferar, na presença de uma resposta inflamatória grave (Murray, 2006; Nuñez, *et al.*, 2008).

#### **1.5.1.3 Toxina delta ( $\delta$ )**

É uma proteína grande, heterogénea e termoestável. Apresenta atividade citolítica de larga amplitude, atuando como uma espécie de detergente, com a capacidade de destruir a membrana celular das células hospedeiras (Murray, 2006).

Tem um papel importante em diarreias provocadas por *S. aureus* (Jawetz, *et al.*, 2007).

#### **1.5.1.4 Toxina gama ( $\gamma$ )**

A toxina  $\gamma$  tem sido alvo de estudos detalhados, uma vez que a sua função ainda não está totalmente esclarecida. Sabe-se que, apresenta uma grande capacidade de lisar eritrócitos, incluindo os do homem, carneiro e coelho, bem como das células linfoblásticas do Homem. No entanto, são necessárias duas proteínas em separado para que a toxina seja ativada (Murray, 2006).

#### **1.5.1.5 Leucocidina**

A leucicidina tem capacidade de lisar os leucócitos. Apresenta dois componentes que agem em conjunto, ou seja, separados não têm qualquer atividade contra a membrana dos leucócitos. A combinação das duas moléculas facilita alterações estruturais na membrana da célula, formando poros e aumentando a permeabilidade. Bactérias que produzem leucocidina têm maior resistência à fagocitose. Esta citotoxina tem sido associada a infecções cutâneas e é um importante fator de virulência associado ao *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (Murray, 2006; Jawetz, *et al.*, 2007).

#### **1.5.1.6 Toxinas exfoliativas**

As toxinas exfoliativas de *S. aureus* são duas proteínas distintas com o mesmo peso molecular. A toxina A é um produto cromossômico e é estável ao calor, resiste aproximadamente 20 minutos a 100°C. A toxina B é mediada por plasmídeos e é altamente lábil ao calor. Estas toxinas provocam descamação da pele no síndrome da pele escaldada, através da dissolução do mucopolissacarídeo da matriz celular da epiderme (Jawetz, *et al.*, 2007).

### 1.5.1.7 Toxina do síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1)

Esta toxina é responsável pelo Síndrome do Choque Tóxico e inicialmente foi designada de enterotoxina F. Atua como superantigénio, ligando-se diretamente ao complexo MHC classe II, aumentando a proliferação das células T e a produção de citocinas inflamatórias. Tem capacidade de atravessar as mucosas e é encontrada em 20% dos isolados do *S. aureus*, provocando febre, choque, erupção cutânea descamativa e o envolvimento de vários órgãos. A sua produção é uma das manifestações mais graves de infecção por *S. aureus* (Jawetz, *et al.*, 2007; Santos, *et al.*, 2007). Dinges, Orwin e Schlievert (2000), relataram que a proteína TSST-1 apresenta uma massa molecular de 22 kD.

### 1.5.1.8 Enterotoxinas Estafilocócicas (SE)

As SE são membros de uma família de mais de vinte exotoxinas estafilocócicas e estreptocócicas diferentes. O grupo das SE estafilocócicas é constituído por nove SE (A, B, C, D, E, G, H, I e J). São altamente patogénicas, por exemplo, a ingestão de 25 µg de SE-B é suficiente para desencadear um fenómeno grave de diarreia e vómitos (Larkin, *et al.*, 2010). Aproximadamente 50% das estirpes de *S. aureus* produzem uma ou mais SE. Estas proteínas bacterianas são conhecidas pela sua atividade de superantigénios e por estarem associadas a patologias graves, como a intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico. Estão também envolvidas em complicações em doentes com dermatite atópica (Bachert, 2007; Schlievert, *et al.*, 2008).

São resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e são estáveis ao aquecimento até 100°C, durante 30 minutos (Becker, *et al.*, 2003; Jawetz, *et al.*, 2007). Uma SE é constituída aproximadamente por 220-240 aminoácidos, apresentando uma sequência variável que é significativa, o seu peso molecular ronda os 25 kD, dependendo da toxina. Contudo, quando se encontram dobradas têm estruturas tridimensionais muito semelhantes (Pinchuk, *et al.*, 2010).

### 1.5.1.9 Superantigénios

Muitos isolados de *S. aureus* especialmente o MRSA, apresentam capacidade de produzir uma ou mais toxinas com atividade de superantigénios, como as SE e a TSST-1(Hu, *et al.*, 2011).

Os superantigénios distinguem-se dos antigénios devido à capacidade que apresentam para ativar uma larga população de células T, aproximadamente 30%, ao contrário dos antigénios “convencionais” que ativam apenas 1% das células T (Iniguez e Fonseca, 2006; Wu, *et al.*, 2010).

O superantigénio é um antigénio que não sofre processamento, ou seja, liga-se diretamente à molécula MHC classe II e à porção variável da cadeia  $\beta$  do recetor presente na superfície da célula T (TCR), fora da fenda de ligação do péptido, como se pode observar na Figura 1.2. A ligação ao ser efetuada fora da fenda de ligação, faz com que, não exista especificidade do TCR para o superantigénio, portanto todos os linfócitos T que contenham na porção variável da cadeia  $\beta$  uma determinada sequência de aminoácidos podem ser estimulados por aquele antigénio. Este processo faz com que ocorra uma estimulação policlonal dos linfócitos T não específicos para o antigénio, ou seja, um determinado conjunto de linfócitos T vai ser estimulado, produzindo diversas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), desencadeando,posteriormente, uma resposta imunológica exacerbada (Macias, *et al.*, 2010; Pinchuk, *et al.*, 2010).

Neste sentido, uma pequena quantidade de superantigénio ( $10^9$  mol/L) pode iniciar a ativação do sistema imunitário de forma muito eficaz. Com o desenvolvimento da sua importância, os superantigénios sido alvo de múltiplos estudos (Jawetz, *et al.*, 2007; Pinchuk, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2010).



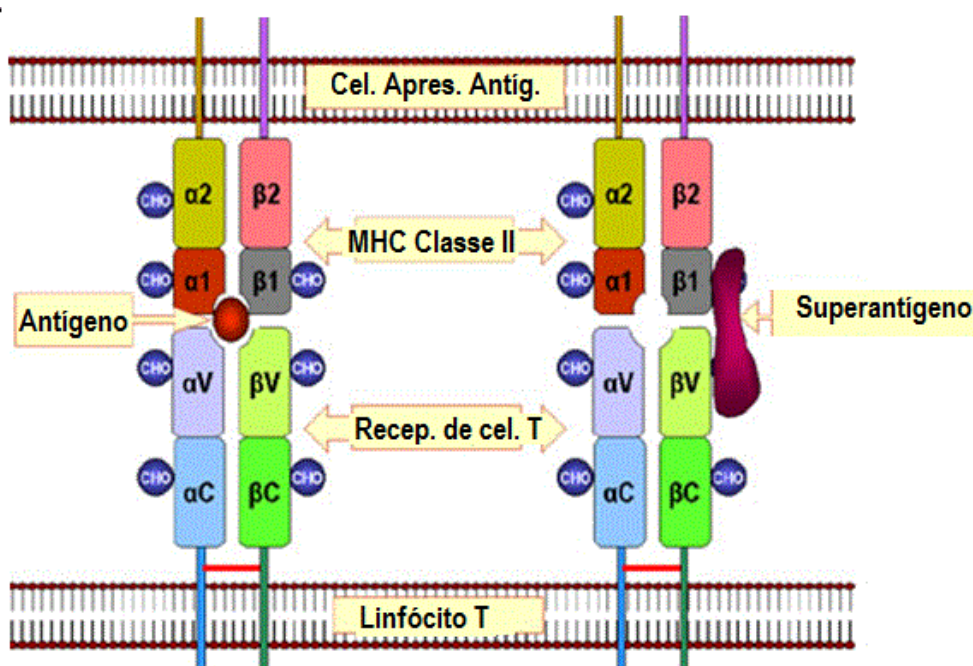


Figura 1.2 - Diferenças entre antígeno e superantígeno (adaptado de Roitt *et al* 2003)

## 1.5.2 Enzimas

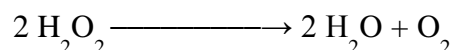
As enzimas produzidas pelo *S. aureus* podem destruir tecidos e assim, provocar facilmente infecção. As de maior relevância clínica são: coagulase, catalase, hialuronidase, fibrinolisinase, lipases e beta lactamase (Cristino, 2000).

### 1.5.2.1 Coagulase

A coagulase é uma enzima termoestável produzida principalmente pelas estirpes de *S. aureus*. Existem duas formas de coagulase: uma “ligada à parede celular” ou “Fator clumping” e outra libertada pela célula bacteriana que é a “coagulase livre”. É capaz de provocar a coagulação do plasma conduzindo ao depósito de fibrina à volta do abscesso formado pelos *Staphylococcus*, e assim fixar a infecção protegendo-os da fagocitose. A produção de coagulase é sinónimo de invasão por um potencial agente patogénico (Jawetz, *et al.*, 2007).

### 1.5.2.2 Catalase

Todos *Staphylococcus* produzem catalase, que funciona como enzima protetora. Em aerobiose, as bactérias utilizam normalmente o oxigénio como aceitador final de eletrões pela via oxidativa (fosforilação oxidativa), que se acumula durante o metabolismo da bactéria ou é libertado a seguir à fagocitose, sob a forma de água e oxigénio. Os átomos de hidrogénio libertados fixam-se diretamente sobre o oxigénio molecular ( $O_2$ ), levando à formação de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Este acumula-se nas células, sendo letal para as bactérias se não for imediatamente degradado pela enzima catalase.



A catalase desdobra o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (Madigan, *et al.*, 2009).

### 1.5.2.3 Hialuronidase

Esta enzima hidrolisa o ácido hialurónico, que se encontra presente na matriz celular do tecido conjuntivo, agindo assim, como fator de propagação do microrganismo. Mais de 90% das estirpes de *S. aureus* produzem esta enzima (Murray, 2006).

### 1.5.2.4 Fibrinolisa

Enzima que ativa o plasminogénio e tem potente ação fibrinolítica. Pensa-se que seja produzida por todas as estirpes de *S. aureus* (Cristino, 2000; Murray, 2006).

### 1.5.2.5 Lipases

Todas as estirpes de *S. aureus* produzem várias lipases diferentes. Estas enzimas hidrolisam os lípidos, os quais são essenciais para o microrganismo invadir a pele e o tecido celular subcutâneo, levando à formação de infeções à superfície da pele, como furúnculos e carbúnculos (Murray, 2006).

### 1.5.3.6 Beta lactamase ( $\beta$ lactamase)

A resistência desenvolveu-se rapidamente, mediada inicialmente pela produção de  $\beta$  lactamase. A rápida disseminação desta enzima é assegurada pela sua presença nos plasmídeos transmissores (Murray, 2006). Atua inativando os antibióticos beta lactâmicos, como por exemplo, as penicilinas e cefalosporinas, pela abertura do anel beta lactâmico (Santos, *et al.*, 2007).

### 1.5.3 Outros fatores de virulência

Existem outros fatores de virulência, como a cápsula e os antígenos proteicos p13 e p17 que se mostram altamente importantes. A cápsula é uma estrutura de natureza polissacarídica, relativamente bem individualizada, que inibe a opsonização e fagocitose. No que diz respeito às proteínas p13 e p17, encontram-se sempre presentes nas estirpes isoladas recentemente de produtos patológicos e quando ocorre a sua perda por variação antigénica há, simultaneamente, perda de virulência (Cristino, 2000).

Outro mecanismo de defesa de *S. aureus* é a capacidade de formar biofilmes, estes são vulgarmente definidos como comunidades de bactérias. Nos casos em que há produção de biofilmes, a bactéria é frequentemente difícil de ser erradicada pelos antimicrobianos mais utilizados, sendo também resistente à resposta imune do hospedeiro. A formação do biofilme é um processo com várias etapas, começando com a adesão da bactéria a uma superfície. Posteriormente, as adesinas bacterianas específicas, referidas como componentes de superfície microbiana, reconhecem as moléculas adesivas da matriz (MSCRAMMS), promovendo a ligação em si. Em seguida, durante a fase de acumulação, os microrganismos fixam-se uns aos outros, formando multicamadas de bactérias e ocorre a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e/ou incorporação de componentes do hospedeiro, como as plaquetas, resultando num biofilme maduro. Em determinadas circunstâncias, como privação de nutrientes por exemplo, ocorre a libertação e dispersão dos microrganismos uns dos outros. Tem sido sugerido que a expressão do gene regulador acessório (*agr*), resulta a produção de moléculas, como a  $\delta$ -toxina que contribui para a dispersão dos microrganismos. O sistema *agr* regula mais de 70 genes, dos

quais 23 são fatores de virulência conhecidos. Estes encontram-se divididos em duas classes: a primeira classe, contém fatores de virulência envolvidos na ligação ao hospedeiro e invasão imune, enquanto a segunda classe contém genes envolvidos na produção de exoproteínas e toxinas (Croes, *et al.*, 2009; Foreman, *et al.*, 2011).

Um estudo de Antunes *et al* (2010) mostra que a formação de biofilme em MRSA é predominantemente regulada por adesinas de superfície, que são reprimidas sob expressão do gene *agr*.

## **1.6 Patologias associadas ao *S. aureus***

Como referido anteriormente, a frequência de infecções estafilocócicas tanto as adquiridas na comunidade como em meio hospitalar têm aumentado significativamente ao longo do tempo, continuando assim, a suscitar cada vez mais o interesse dos investigadores (Lee, *et al.*, 2011). *S. aureus* desenvolveu um conjunto de defesas que lhe permitem escapar às defesas do hospedeiro, nomeadamente a produção de um conjunto de enterotoxinas, conferindo-lhe elevada facilidade de colonização e resistência à antibioterapia (Thammavongsa, *et al.*, 2009). A atividade destas enterotoxinas baseia-se, não só em mecanismos tóxicos como também, na produção de IgE específica anti-SE (Host, *et al.*, 2003; Ong, *et al.*, 2008).

A maioria dos genes que codificam para as SE está localizada em elementos móveis como os plasmídeos ou ilhas de patogenicidade. Estas interagem com elementos genéticos acessórios como é o caso dos bacteriófagos, produzindo assim toxinas (Jawetz, *et al.*, 2007; Pinchuk, *et al.*, 2010).

### 1.6.1 Intoxicação alimentar

As intoxicações alimentares estafilocócicas são uma das patologias mais frequentes transmitidas por alimentos. Devem-se à ação das toxinas bacterianas presentes em alimentos, como carne e presunto curados com sal, bolos com creme, gelados, saladas e batatas. A proliferação de *S. aureus* em alimentos com sal deve-se à capacidade que o microrganismo tem para se desenvolver em ambientes com elevadas concentrações salinas. Ao contrário do que ocorre em outro tipo de intoxicação alimentar, em que o reservatório animal desempenha um papel relevante, nas intoxicações provocadas por *S. aureus*, a contaminação dos alimentos é provocada por um portador humano. Este tipo de contaminação pode ser evitável, por exemplo, indivíduos com patologias dermatológicas evidentes não devem preparar alimentos. Alguns estudos têm mostrado que, pelo menos metade deste tipo de intoxicação é provocada por portadores nasais *S. aureus* (Nuñez, *et al.*, 2008; Larkin, *et al.*, 2010).

As SE têm uma notável capacidade de resistir ao calor e ao ácido. Devido a estas propriedades, não são destruídas se os alimentos não forem muito bem cozinhados. Uma vez ingeridos alimentos contaminados com *S. aureus* produtores de SE, desencadeia-se uma série de reações gastrointestinais tais como, vômitos e diarreia, já que as SE são resistentes à inativação por proteases gastrointestinais, incluindo a pepsina, tripsina, renina e papaína. Loir *et al.* (2003) defendem que as SE, devido às suas propriedades, podem manter-se facilmente no hospedeiro mais tempo do que as bactérias que as produzem.

O início da doença é abrupto e rápido, com um período médio de incubação de quatro horas após a ingestão dos alimentos contaminados. O tratamento consiste em repor os valores de líquidos. Os anticorpos capazes de neutralizar a toxina podem conferir proteção e pode existir uma limitada reatividade cruzada entre as diferentes SE (Loir, *et al.*, 2003; Larkin, *et al.*, 2010).

SE-A é responsável por aproximadamente 80% dos casos de intoxicações alimentares enquanto que, a SE-B é responsável por 10%. Esta patologia é habitualmente tratável e raramente é letal, sendo as crianças o grupo mais afetado (Pinchuk, *et al.*, 2010).

### 1.6.2 Síndrome do Choque Tóxico (TSS)

O primeiro caso de síndrome de choque tóxico descrito foi na Austrália em 1928, onde a doença afetou vinte e uma crianças, doze das quais faleceram depois de terem recebido uma vacina contaminada com *S. aureus*. Cinquenta anos depois do aparecimento do primeiro episódio, Tood (1978) descobriu este síndrome em sete meninos com doenças sistêmicas e em 1980, tornaram-se públicos os primeiros casos associados a mulheres jovens menstruadas e que usavam tampões como absorventes (Todd e Fishaut, 1978; Lowy, 1998)

Inicialmente, descreveu-se que *Staphylococcus* coagulase negativos é que originavam a doença. Hoje, sabe-se que a patologia é restrita ao *S. aureus* e pelo contrário, não é restrita a mulheres menstruadas. Aproximadamente, 40-60% dos casos não estão associados a quadros menstruais. Pensa-se que sejam necessários quatro fatores importantes para desenvolver TSS associado à menstruação: colonização vaginal por *S. aureus*, produção de TSST-1, penetração de uma quantidade significativa de TSST-1 capaz de atravessar a mucosa e causar doença e por último, não produzir concentrações suficientes de anticorpos contra a toxina (Parsonnet, *et al.*, 2010). A patologia tem início com o crescimento localizado de certas estirpes de *S. aureus* produtores da toxina TSST-1 na vagina ou em resultado a algum tipo de complicação, principalmente na pele ou no trato respiratório, seguida da libertação da toxina na corrente sanguínea.

Esta patologia é caracterizada por um início fulminante, tanto nos quadros menstruais como nos não menstruais e ocorre frequentemente em pessoas saudáveis (Larkin, *et al.*, 2010). As manifestações clínicas surgem rapidamente e consistem em febre, hipotensão, descamação da pele nos pés e nas mãos e falência multiorgânica. A alta taxa inicial de falecimentos diminuiu aproximadamente 5%, ao conhecer-se melhor a epidemiologia e etiologia da doença. Contudo, o índice de recidiva chega a alcançar os 65% a não ser que, o paciente faça medicação adequada e eficaz. Estudos serológicos mostram que, mais de 90% dos adultos apresentam anticorpos contra a TSST-1. No entanto, mais de 50% dos pacientes com TSS não produzem anticorpos, apresentando um risco significativo de recidiva (Jarraud, *et al.*, 1999; Jawetz, *et al.*, 2007; Murray, *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Endocardite

A endocardite aguda provocada por *S. aureus* constitui uma patologia grave e com uma taxa de mortalidade aproximadamente de 50%. Estes doentes apresentam febres altas, envolvimento das válvulas cardíacas, dor torácica e produção de elevados níveis de líquido pleural, produzido pela presença de êmbolos no pulmão. O prognóstico dos pacientes é desfavorável, a não ser que seja efetuado um procedimento cirúrgico imediato. Ocorre frequentemente em utilizadores de drogas intravenosas, em pacientes com válvulas cardíacas e em pacientes hospitalizados (Lowy, 1998; Murray, *et al.*, 2007). Sabe-se que a formação de biofilmes por parte de *S. aureus* é uma explicação para a dificuldade em tratar endocardites, uma vez que, a sua existência complica muito a ação dos antimicrobianos (Pasternak, 2009).

### 1.6.4 Bacteremia

*S. aureus* é uma causa frequente de bacteremia. Normalmente, este tipo de infeção tem sempre um foco de infeção identificável, como uma infeção pulmonar, infeção do aparelho genitourinário ou do aparelho digestivo. Apenas num terço dos doentes com bacteremia provocada por *S. aureus* não se conhece o foco de infeção inicial. Nestes casos, o mais provável é que a infeção se tenha dispersado até à corrente sanguínea a partir da colonização da pele pelo microrganismo. Mais de 50% dos casos de bacteremia adquirem-se no hospital, após uma intervenção cirúrgica ou devido ao uso de cateteres intravasculares contaminados, estando associadas à disseminação a outras partes do organismo como por exemplo, o coração (Lowy, 1998; Murray, *et al.*, 2007; Tang e Stratton, 2010).

## 1.7 Resistência à antibioterapia

As diferentes espécies bacterianas, principalmente as causadoras de doença para o homem, desenvolveram mecanismos para resistir à ação inibitória dos agentes microbianos, tornando-se um problema global e de prevalência crescente. A grande promessa dos antibióticos, um dos principais avanços da medicina na segunda metade do Século XX, desmoronou frente ao implacável desenvolvimento de resistência pelas bactérias contra as quais a terapia é direcionada. Não existe nenhuma bactéria clinicamente importante que não tenha desenvolvido algum tipo de resistência aos agentes antimicrobianos (Couto, *et al.*, 2009; Olaechea, *et al.*, 2010).

### 1.7.1 Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

A resistência de *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações nos seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie. Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no local de ação do antibiótico enquanto que, a resistência através da aquisição de genes de resistência está frequentemente associada à inativação ou destruição do fármaco, sendo transmitida por plasmídeos (Santos, *et al.*, 2007). A resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos deve-se a quatro mecanismos: hidrólise enzimática dos  $\beta$ -lactâmicos, através das  $\beta$ -lactamases, modificação dos alvos (PBPs), impermeabilização da membrana externa e bombas de efluxo (Foster, 2004).

A meticilina é um antibiótico do grupo das penicilinas e foi a primeira penicilina semissintética utilizada clinicamente. Pertence ao grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e foi durante muito tempo um dos compostos mais utilizados no tratamento de infeções bacterianas, devido à sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade para o organismo (Murray, 2006).

A literatura descreve que a resistência à meticilina resultou da aquisição pelo *S. aureus* do gene *mecA*. Este gene codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a), com baixa afinidade para os antibióticos e a sua presença confere resistência a este tipo de fármacos.



A região *mec* é constituída pelo gene *mecA*, sendo os genes *mecI* e *mecR1* elementos reguladores que controlam a transcrição do gene *mecA*. Assim, a presença de PBPs alteradas e a síntese de  $\beta$ -lactamases são fatores determinantes para a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Atualmente, encontram-se descritas mais de 200  $\beta$ -lactamases diferentes (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, entre muitas outras). Se a resistência for independente de PBP2a, as infecções podem ser tratadas com meticilina, oxacilina ou inibidores de  $\beta$ -lactamases. Pelo contrário, nas dependentes de PBP2a devem ser administrados vancomicina ou teicoplanina (Foster, 2004; Kanafani e Vance, 2006).

Neste sentido, o laboratório desempenha um papel importantíssimo ao fornecer ao clínico o mecanismo de resistência envolvido, sendo uma mais-valia na escolha do antimicrobiano adequado.

## 1.8 MRSA em Profissionais de Saúde

O portador de MRSA tem sido considerado a mais silenciosa, porém a mais perigosa fonte da bactéria. Não existe forma de reconhecer estes portadores a não ser efetuando rastreios regulares. Estes indivíduos albergam no seu organismo o agente infeccioso, no entanto, não apresentam qualquer sintomatologia. A colonização não é uniforme e distribui-se pelas diferentes partes do organismo que estão em contacto com o meio externo, principalmente pele e mucosas (Kanafani e Vance, 2006).

Os profissionais de saúde são o grande grupo de portadores de MRSA, adquirindo o microrganismo através do contacto com doentes infetados, podendo depois transmiti-lo a outros doentes e até mesmo a indivíduos saudáveis, principalmente através das mãos e aerossóis. Estas considerações despertam o interesse em conhecer o grau de colonização pelo *S. aureus* e a evolução do estado de portador em profissionais de saúde. Assim, é de extrema importância realizar com frequência rastreio de portadores de *S. aureus* em unidades hospitalares, com objetivo de tentar erradicar o microrganismo entre profissionais e consequente, entre doentes e a restante comunidade (Verkaik, *et al.*, 2009; Lee, *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de um programa de vigilância epidemiológica é o primeiro passo e é essencial para identificar problemas e prioridades locais, com objetivo de diminuir a frequência infecções hospitalares. Existem cuidados específicos que se devem ter na prestação de cuidados de saúde: é importante o uso de máscara, luvas e uma correta higienização das mãos, usar unhas limpas e curtas, a roupa deve ser coberta por uma bata, na impossibilidade de usar farda. É de salientar que estas medidas são importantes para assegurar a proteção do profissional e do doente (PNCI, 2004).

## 1.9 MRSA do hospital para a comunidade

Após o aparecimento de MRSA em instituições de saúde, associa-se sempre e frequentemente a uma causa de infeção hospitalar. No entanto, têm surgido cada vez mais fora do meio hospitalar, ou seja, em indivíduos que não estiveram internados, nem foram submetidos a procedimentos médicos como diálise, cirurgia ou cateteres. Um exemplo, são os doentes com dermatite atópica que habitualmente estão colonizados por *S. aureus*, pois apresentam alterações a nível da primeira linha de defesa, a pele, surgindo lesões cutâneas graves, provocadas pela desidratação, devido ao défice lipídico e facilitando a colonização por agentes patogénicos. Estes indivíduos funcionam como importantes vetores de transmissão (Kisich, *et al.*, 2008; Tortora, *et al.*, 2010).

Assim, estudos relatam que em 1997, 29% dos adultos saudáveis fora do meio hospitalar estavam colonizados a nível nasal por MRSA. Hoje, sabe-se que esse valor aumentou para 74% (EARSS, 2008). Este tipo de colonização é provocado por isolados de *S. aureus* diferentes daqueles encontrados na comunidade hospitalar, sendo referidos como MRSA associado à comunidade (CA-MRSA). São produtores frequentes de exotoxinas como as leucocidinas e enterotoxinas, que podem provocar o aparecimento de infeções graves, como a pneumonia necrosante associada à comunidade, abscessos e erupções na pele. A sua transmissão ocorre por contacto físico, sendo comum em infantários, escolas, em atletas, militares e homossexuais masculinos (Qu, *et al.*, 2010; Tang e Stratton, 2010).

Alguns estudos mostraram que o CA-MRSA tem alto potencial para se tornar endémico na comunidade e que isto terá um impacto significativo no controlo de MRSA em ambiente

hospitalar (Kanafani e Vance, 2006; Kluytmans-Vandenbergh e Kluytmans, 2006; Tang e Stratton, 2010).

Portugal é um dos países da Europa, em conjunto com Malta, que apresenta taxas de MRSA mais elevadas (Figura 1.3), acima de 50% (EARSS, 2008; Chen, *et al.*, 2010; Lee, *et al.*, 2011).

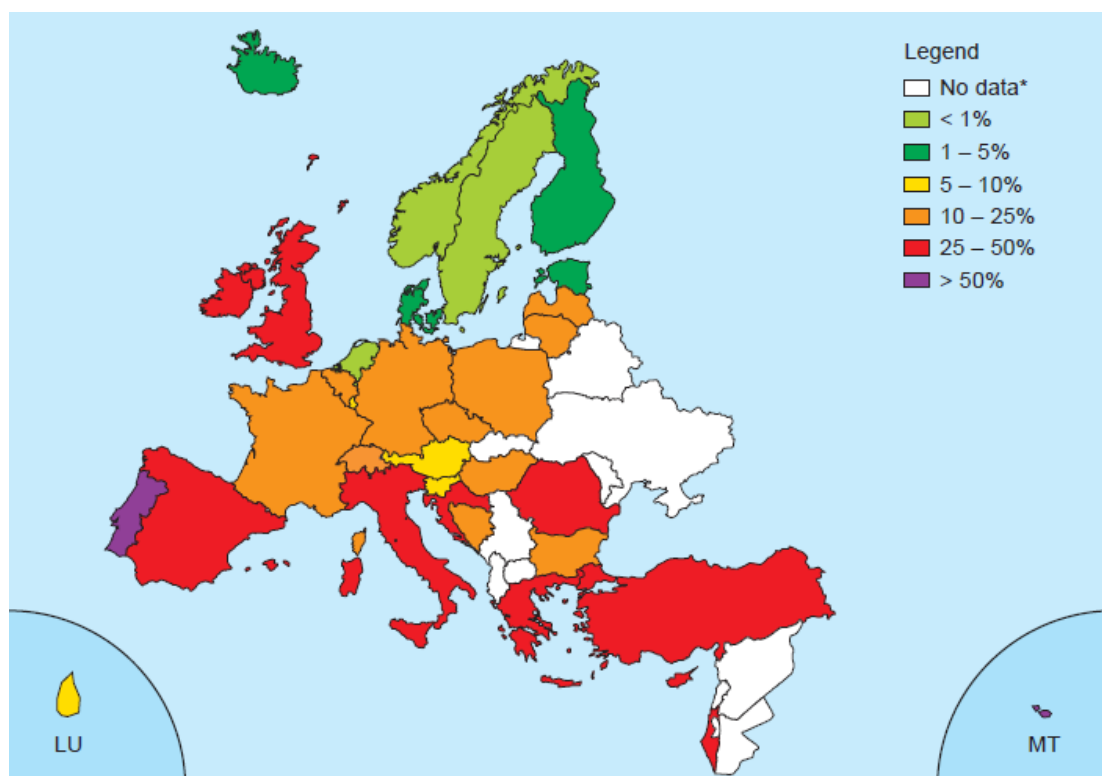


Figura 1.3 – Prevalência de MRSA a nível Europeu no ano de 2008 (EARSS, 2008)

## 1.10 *S. aureus* e Doença Alérgica

Nas últimas décadas, o papel que *S. aureus* desempenha na alergia tem sido alvo de inúmeros estudos, uma vez que, a sua prevalência na doença alérgica tem aumentado significativamente, principalmente em países desenvolvidos. Estima-se que 25% da população mundial apresenta algum tipo de doença alérgica, sendo a Dermatite Atópica (DA) o melhor exemplo da relação de *S. aureus* com alergia. Vários estudos mostram a elevada associação que existe entre a produção de enterotoxinas do *S. aureus* e a consequente produção de IgE específica antienterotoxinas, em casos de asma refractária severa, rinite alérgica, rinosinusite e pólipos nasais (Bachert, 2007; Nuñez, *et al.*, 2008; Kowalski, *et al.*, 2011).

### 1.10.1 Sistema Imunitário e Resposta Imunológica

O Sistema Imunitário (S.I.) apresenta uma complexidade semelhante à do Sistema Nervoso, devido à capacidade de produzir uma enorme variedade de células efectoras e moléculas capazes de reconhecer e eliminar especificamente um número teoricamente ilimitado de agentes agressores (Roitt, *et al.*, 2003).

Funcionalmente, uma resposta imunológica pode ser dividida em duas atividades que se relacionam: o reconhecimento e a resposta. A primeira é responsável pela elevada especificidade da resposta imunológica e permite reconhecer diferenças estruturais extremamente subtis, distinguindo os diferentes agentes patogénicos, as moléculas estranhas ao organismo e moléculas do próprio. Uma vez reconhecido o agente patogénico, o S.I. recruta uma grande variedade de células e moléculas capazes de o eliminar ou neutralizar – resposta efectora. Uma reexposição a este organismo estranho induz uma resposta imunológica mais rápida e eficaz, o que atesta a capacidade de memória deste sistema. As respostas imunológicas são constituídas por respostas humorais e respostas mediadas por células, que cooperam e interagem uma com a outra para produzir uma defesa mais eficaz (Roitt, *et al.*, 2003)

Os anticorpos ou Imunoglobulinas (Ig), são proteínas de ligação aos antígenos/alérgenos que estão presentes na membrana dos linfócitos B (o que confere a especificidade antígenoica a estas células) e são secretados pelos plasmócitos. Estes anticorpos circulam no sangue, onde servem como moléculas efectoras da imunidade humoral, bloqueando antígenos e formando imunocomplexos. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e apresentam como função a neutralização de toxinas e vírus, a fagocitose de microrganismos, ativação do complemento, prevenir a passagem de microrganismos através das mucosas e ainda apresentam, atividade enzimática (Levinson, 2008).

As Ig têm uma estrutura comum, constituída por quatro cadeias peptídicas, idênticas duas a duas (cadeias leves e cadeias pesadas). Cada cadeia leve liga-se a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfureto e por interações não covalentes, tais como pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas, formando um heterodímero. De forma similar, interações não covalentes e pontes dissulfureto ligam as duas cadeias pesadas, dando origem à estrutura final do anticorpo ou imunoglobulina. O número e a posição precisa destas ligações dissulfídricas diferenciam as classes e subclasses de imunoglobulinas (Figura 1.6) (Kuby, *et al.*, 2003).

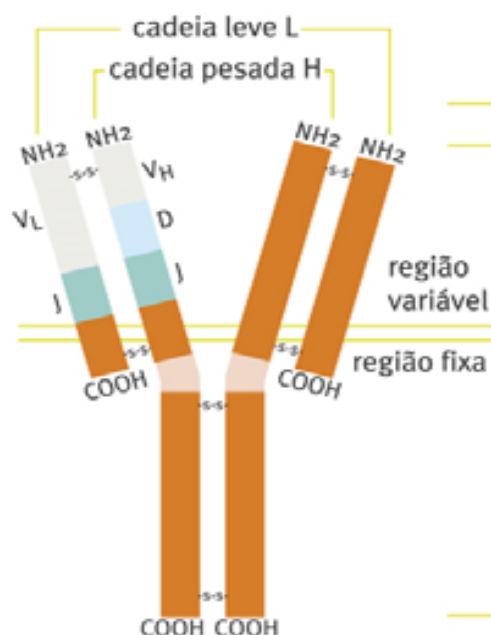


Figura 1.4- Estrutura molecular de uma imunoglobulina (retirada de [www.reckeweg.pt/circular/jun\\_2003/jun\\_2003.htm](http://www.reckeweg.pt/circular/jun_2003/jun_2003.htm))

### 1.10.2 Imunoglobulina E

A IgE encontra-se em concentrações muito baixas no soro (0.3 µg/ml) quando comparada com as restantes imunoglobulinas, mas possui uma atividade biológica importante na defesa antiparasitária e na doença alérgica. As razões para as concentrações tão baixas no soro podem ser explicadas por vários motivos: a IgE sérica possui uma semivida apenas de 2 dias e meio contra 21-23 dias da IgG; é produzida em pequenas quantidades e apenas em resposta a um grupo restrito de antígenos (alergénios e parasitas); e ficam retidas no recetor de alta afinidade dos basófilos e mastócitos (Kuby, *et al.*, 2003).

Caracteriza-se por cadeias pesadas que contêm uma região variável e quatro regiões constantes e tem um peso molecular de 190.000 (Roitt, *et al.*, 2003). Numa resposta humoral alérgica, após exposição ao alergénio, os plasmócitos produzem IgE. Esta liga-se com alta afinidade aos recetores Fc (FcεRI) da membrana dos basófilos sanguíneos e mastócitos tecidulares promovendo a sua sensibilização. Uma exposição posterior ao mesmo antígeno/alergénio permite a ligação deste aos locais de ligação antigénica das IgE, induzindo a libertação do conteúdo dos grânulos existentes nos basófilos e mastócitos para o meio extracelular (desgranulação). Como resultado, uma variedade de mediadores farmacologicamente ativos são libertados, dando origem a manifestações alérgicas.

Alguns estudos mostram que, a produção de IgE é absolutamente dependente das células T, e também que as células T são capazes de suprimir a produção de IgE. A diferenciação dos linfócitos T em, T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2) permitiu estabelecer que a produção de IgE é dependente dos linfócitos Th2 e que qualquer tipo de sensibilização que leve a uma resposta por Th1 inibe a produção de IgE. Este tipo de diferenciação dos linfócitos T depende da fonte de antígeno, da quantidade de alergénio e das citocinas produzidas (Host, *et al.*, 2003; Davies e O'Hehir, 2008).

Apesar da excepcional organização e complexidade, por vezes o S. I. pode desregular-se, não protegendo corretamente o organismo ou dirigindo a sua ação de forma inadequada, ocasionando as mais diversas manifestações, que podem ir do desconforto até à morte. As manifestações mais comuns das disfunções do S.I. incluem a doença alérgica, as doenças autoimunes, as imunodeficiências, a rejeição de transplantes e a doença do enxerto contra o hospedeiro (Kuby, *et al.*, 2003).

### 1.10.3 Reações de hipersensibilidade/ Doença alérgica

A resposta imunológica mobiliza uma bateria de células e moléculas efectoras, que atuam com o objetivo de remover os antígenos. Estas moléculas induzem uma resposta inflamatória localizada, que elimina o antígeno sem causar dano nos tecidos do hospedeiro. No entanto, por vezes, esta resposta inflamatória pode ter um desvio não adequado, resultando em danos graves nos tecidos do hospedeiro e podendo mesmo causar a morte. Estas respostas inapropriadas foram designadas por reações de hipersensibilidade ou alergias.

Na doença alérgica verifica-se uma resposta imunológica inapropriada dirigida contra alérgenos que não constituem *per si* qualquer perigo para o organismo. Os alérgenos apresentam funções biológicas diversas, podendo ser enzimas, inibidores enzimáticos ou proteínas estruturais. A sua função não está relacionada com a maior ou menor capacidade de induzir respostas IgE-mediadas (Kuby, *et al.*, 2003).

A Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica define alergia como “uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos que pode ser mediada por células ou anticorpos”. A mesma academia define atopia como “uma tendência pessoal ou familiar que leva à produção exagerada de IgE em resposta a baixas doses de alérgenos” (Johansson, *et al.*, 2001).

A doença alérgica é atualmente um problema de saúde a nível mundial. Atinge uma proporção importante da população (estima-se que aproximadamente 40% da população mundial seja atópica) e, por razões ainda pouco documentadas, a prevalência desta doença está a aumentar. Os fatores exógenos melhor conhecidos e considerados mais importantes no aumento desta prevalência, incluem os próprios alérgenos, as infeções, a poluição atmosférica e os hábitos de vida, de que são exemplo os hábitos tabágicos, a utilização de antibióticos, o sedentarismo e as alterações da flora bacteriana intestinal. A predisposição genética é considerada também um fator importante no aparecimento da doença alérgica (Ahlstedt, 2002).

De uma forma geral, todos os indivíduos com possíveis “sintomas alérgicos” graves, persistentes ou recorrentes, que incluem sintomas gastrointestinais (vómitos, diarreia,

cólicas, atrasos de crescimento), dermatite atópica, urticária, tosse, sibilância, dispneia de duração prolongada, rinite, conjuntivite, reação a picadas de insetos e anafilaxia, e indivíduos com necessidade de terapêutica preventiva continuada devem ser estudados quanto à presença de uma alergia específica. A amplitude do estudo dependerá da idade do doente, história familiar e do tipo de sintomatologia (Johansson, *et al.*, 2001).

As reações de hipersensibilidade dividem-se em quatro tipos. Três destes ocorrem a nível humoral e são mediados por anticorpos ou complexos antígeno-anticorpo: tipo I (reações mediadas por IgE), tipo II (reações mediadas por outras classes de imunoglobulinas), tipo III (reações mediadas por imunocomplexos). Um quarto tipo de reação de hipersensibilidade depende de reações mediadas por células e denominam-se reações de hipersensibilidade retardada (tipo IV) (Johansson, *et al.*, 2001; Roitt, *et al.*, 2003).

Nas reações de tipo I, o anticorpo responsável pela reação de hipersensibilidade ou reação alérgica é a IgE, designando-se alergia mediada por IgE. A sensibilização é provocada pelo contacto com um alérgeno e pela produção de IgE devido a um desequilíbrio na regulação da população de células Th, havendo um predomínio na produção de citocinas Th2. As IgE produzidas ligam-se a recetores de alta afinidade, presentes nos mastócitos e basófilos, e o alérgeno liga-se então aos locais de ligação antigénica desta IgE de superfície, dando origem ao processo que leva à libertação de mediadores inflamatórios como histaminas, prostaglandinas, leucotrienos e fatores de ativação de plaquetas, que provocam os sintomas característicos de alergia (Johansson, *et al.*, 2001).

Na doença alérgica típica mediada por IgE, a exposição a um alérgeno desencadeante provoca uma resposta bifásica, caracterizando-se a reação precoce por uma clássica hipersensibilidade de tipo imediato mediada por IgE, a que se segue 3 a 6 horas depois, uma resposta tardia caracterizada pela presença de uma inflamação eosinofílica. Se houver exposição diária ao alérgeno, surge inflamação persistente que provoca alterações estruturais e funcionais responsáveis por sintomas prolongados, o que se traduz no aumento da severidade da doença (Host, *et al.*, 2003).



#### 1.10.4 *S. aureus* e atopia

Em doentes ou portadores de *S. aureus* atópicos, as enterotoxinas produzidas por este microrganismo são capazes de estimular os linfócitos T. Uma vez ativados, os linfócitos T produzem interleucinas como a IL-4, IL-5 e IL-13 e muitas outras citocinas, as quais vão provocar eosinofilia severa, provocando inflamação e produção de IgE. A maior parte dos estudos mostra que, indivíduos atópicos apresentam maior incidência de colonização pelo *S. aureus* e consequente produção de toxinas estafilocócicas e IgE específicas antienterotoxinas, uma vez que, o seu sistema imunitário mostra uma resposta exagerada de produção de IgE em resposta a baixas doses de alérgeno (Bachert, *et al.*, 2002; Nuñez, *et al.*, 2008).

O grupo de doenças atópicas, inclui a dermatite atópica, rinite alérgica e asma. É importante referir que, a sua frequência tem aumentado significativamente nas últimas décadas, afetando mais de 25% da população em países desenvolvidos (Bachert, *et al.*, 2002; Borrego, *et al.*, 2008; Zheng, *et al.*, 2011).

A dermatite atópica é a patologia que melhor ilustra a relação de *S. aureus* e atopia. Ao longo dos últimos 20 anos tem sido repetidamente estudada, devido ao papel das enterotoxinas estafilocócicas. Estes doentes, caracterizam-se por apresentarem graves lesões a nível da primeira linha de defesa, a pele, apresentando lesões cutâneas provocadas pela desidratação, devido ao défice lipídico, facilitando a colonização por microrganismos, nomeadamente *S. aureus*. O que demonstra que, para além das patologias atrás descritas as suas toxinas estão também envolvidas em reações alérgicas já que o número de colónias de *S. aureus* é 100 a 1000 vezes mais elevado na pele com lesões, quando comparado com áreas normais da pele de doentes com DA. Por outro lado, um aumento significativo de colónias é encontrado na pele aparentemente normal de doentes com DA, quando comparado com a pele de indivíduos normais (Nuñez, *et al.*, 2008). Alguns estudos mostraram que, em 50 a 85% dos casos de DA crónica há produção de IgE específicas antienterotoxinas do *S. aureus*. Estas concentrações de IgE podem correlacionar-se com a severidade da doença e com o número de colónias de *S. aureus* presentes na pele. Além disso, doentes que apresentam na pele *S. aureus* que produz toxinas e anticorpos IgE contra essas toxinas, têm DA significativamente mais severa. Isto sugere que, doentes com

infecções mais graves têm mais predisposição para produzir IgE antienterotoxinas e que, as toxinas produzidas pelo *S. aureus* e as IgE antienterotoxinas devem ser quantificadas sempre em simultâneo, para avaliar os seus efeitos na DA e na sua gravidade (Nuñez, *et al.*, 2008; Macias, *et al.*, 2010).

#### **1.10.4.1 Portador nasal de *S. aureus* e a sua relação com atopia**

Sabe-se que indivíduos atópicos apresentam frequentemente prurido e inflamação nasal, sendo um alvo fácil à colonização por *S. aureus* devido a alterações na mucosa nasal que facilitam essa colonização. O estado de portador nasal pode fazer com que reações de hipersensibilidade pré-existentes se tornem exacerbadas, como a asma, rinite e dermatite atópica apesar da relação com estas patologias não parecer óbvia. Neste sentido, a presença de *S. aureus* está diretamente relacionada com o agravamento dos sintomas da doença alérgica. Contudo, nem todos os indivíduos portadores e atópicos apresentam IgE específica antienterotoxinas de *S. aureus*, ao contrário de outros indivíduos que estão sensibilizados com a IgE específica e não são atópicos (Breuer, *et al.*, 2001; Nuñez, *et al.*, 2008).

Estima-se que este tipo de reação alérgica esteja relacionado com as propriedades de superantigénios das enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus*, sendo a causa de fenómenos atópicos graves (Nuñez, *et al.*, 2008). A aderência do microrganismo à superfície nasal é mediada por recetores da parede bacteriana para a fibronectina e laminina, presentes na mucosa das células epiteliais. Devido à sua presença os monócitos, macrófagos e células dendríticas produzem IL-18, citocina inflamatória que em conjunto com a IL-4 e IL-13, estimulam a produção de IgE em indivíduos com patologias atópicas (Breuer, *et al.*, 2001).

Sabe-se que nos portadores nasais há produção de enterotoxinas por parte do *S. aureus*, nomeadamente a SE-A e SE-B, aumentando o agravamento da infeção em conjunto com a produção de IgE específicas antienterotoxinas (Nuñez, *et al.*, 2008).

#### 1.10.4.2 Doentes com infeção por *S. aureus* e a sua relação com atopia

Como referido anteriormente *S. aureus* é responsável por grande variedade de patologias, uma vez que, apresenta uma habilidade única para se multiplicar na corrente sanguínea e em outros tecidos do hospedeiro, provocando infeções persistentes. Para sobreviver, *S. aureus* escapa a uma variedade de mecanismos por parte das células do hospedeiro, como por exemplo a fagocitose. Indivíduos imunodeprimidos apresentam índices elevados de colonização por *S. aureus*. Aproximadamente, 10-40% dos doentes na altura de admissão hospitalar, estão colonizados a nível nasal pelo *S. aureus*, apresentando assim, reservatórios de infeção podendo também, disseminar o microrganismo a outros pacientes e profissionais de saúde. São de extrema importância as boas práticas de higiene em meio hospitalar, com o objetivo de evitar estas transmissões cruzadas (Eiff, *et al.*, 2001).

Não deixa de ser curioso e surpreendente, que o risco de morte em indivíduos portadores de *S. aureus* com bacteremia é significativamente mais baixo do que em indivíduos não portadores com bacteremia (Eiff, *et al.*, 2001). Estas observações não têm uma explicação totalmente conhecida e esclarecida, mas pensa-se que esteja relacionada com o facto de 80% dos isolados de *S. aureus* que provocam bacteremia terem origem endógena, devido a uma exposição prolongada ao isolado colonizador, desenvolvendo anticorpos contra o microrganismo. Deste modo, ao contrário dos indivíduos não portadores, podem produzir anticorpos que os protegem da colonização nasal, apresentando assim, baixo risco para adquirir bacteremia por *S. aureus*. No entanto, as enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* são encontradas em altos níveis, tanto em portadores como em não portadores, sendo as mais prevalentes a SEA, SEB, SEC e TSST-1 (Verkaik, *et al.*, 2009). Uma vez que, a ação destas toxinas não se baseia apenas em mecanismos tóxicos pode ocorrer também, a produção de anticorpos do tipo IgE antienterotoxinas, tanto em indivíduos atópicos como em não atópicos. Assim, estes doentes apresentam três problemas graves, a infeção por *S. aureus*, a produção de toxinas e ainda a produção de anticorpos do tipo IgE contra toxinas (Aalberse, 2000).

É de referir, que praticamente não existem estudos em Portugal que mostrem relação entre doentes com infeção por *S. aureus* e portadores de *S. aureus* relativamente à produção de IgE específicas antienterotoxinas e produção de toxinas. Assim, este estudo é de extrema importância.

O estudo incidiu na pesquisa de enterotoxinas e IgE antienterotoxinas de *S. aureus* em doentes com infeção atópica e não atópica e em portadores atópicos e não atópicos.

## 1.11 Objetivos

A finalidade do trabalho realizado foi esclarecer, se a produção de toxinas leva à produção de IgE específica contra essas toxinas, se este processo só ocorre em indivíduos atópicos, e se doentes com infeção apresentam concentrações mais elevadas de IgE específica do que portadores.

Para tal efetuou-se a:

- determinação da concentração de Ig E específica para uma mistura de alérgenos inalantes (*Phadiatop*) em doentes com infeção por *S. aureus* e em portadores;
- determinação da concentração de IgE específica antitoxinas de *S.aureus* em doentes com infeção por *S. aureus* atópicos e não atópicos;
- determinação da concentração de IgE específica antitoxinas de *S. aureus* em portadores atópicos e não atópicos;
- identificação da toxina produzida pelas estirpes de *S. aureus* presentes em doentes e portadores atópicos e não atópicos.

## **II - Material e Métodos**

## **2.1 Local e Período do Estudo**

Este estudo foi realizado com amostras biológicas provenientes do Hospital Sousa Martins (HSM), inserido na Unidade Local de Saúde da Guarda, desde janeiro de 2011 a setembro de 2011. As colheitas foram efetuadas em diferentes serviços do HSM. O processamento laboratorial foi efetuado no Serviço de Patologia Clínica do HSM, que está dividido em 5 setores: Bioquímica, Imuno-Hematologia, Imunologia, Biologia Molecular e Microbiologia.

## **2.2 Amostra**

### **2.2.1 Indivíduos doentes**

Para este estudo utilizaram-se 47 isolados clínicos de *S. aureus*, cedidos pelo Setor de Microbiologia, do Serviço de Patologia Clínica do HSM, obtidos de infecção com diversas origens e de diferentes serviços do hospital, tais como, Pneumologia, Medicina, Ortopedia, Ginecologia, Neurologia, Cirurgia e Unidade de Cuidados Intensivos (UCI). Simultaneamente, utilizaram-se 47 amostras de soro destes mesmos doentes.

### **2.2.2 Portadores**

Para identificar portadores de *S. aureus*, foram efetuadas colheitas de exsudados nasais em 74 indivíduos que se encontravam em contacto direto com doentes. Foram incluídos nesta categoria: médicos, enfermeiros e auxiliares de ação médica. Os serviços alvos foram: Pneumologia, Medicina, Cirurgia, UCI, Ortopedia, Urgência, Raio X e Laboratório de Patologia Clínica. Depois de identificados os portadores foram efetuadas colheitas de sangue.

Todas as amostras foram processadas segundo as normas Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e também, segundo as normas internas do laboratório,

cumprindo-se as disposições legais que regulam a utilização de produtos biológicos de origem humana (Diário da Republica-I Série A, nº 18 de 26 de janeiro de 2005).

## **2.3 Critérios de seleção das amostras biológicas**

A recolha das amostras dos doentes teve como critério de inclusão, o resultado positivo para *S. aureus*, excluindo-se amostras provenientes do mesmo local anatómico com um período igual ou inferior a 8 dias (PNCI, 2004). Relativamente, às amostras dos portadores, seleccionaram-se profissionais de saúde que se encontram em contacto direto com doentes e que fossem portadores de *S. aureus*.

## **2.4 Colheita das amostras biológicas**

### **2.4.1 Exsudado nasal**

Para o rastreio de portador de *S. aureus* foi efetuada uma colheita de exsudado nasal, introduzindo-se a zaragatoa na narina paralelamente ao palato e deixando-se nessa posição durante uns segundos, de forma absorver secreções. Em seguida, introduziu-se um pouco mais fundo na mucosa nasal até lacrimejar, rodando ligeiramente a zaragatoa. Repetiu-se este procedimento na outra narina, utilizando a mesma zaragatoa.

As zaragatoas utilizadas eram de Dacron, (Deltalab®) adequadas para a manutenção da viabilidade dos microrganismos até ao seu processamento.

### **2.4.2 Colheita de sangue**

Em paralelo às colheitas de exsudados, foram colhidos 10 ml de sangue em tubos de vácuo (Sarstedt®), utilizando agulhas 0,8 x 25 mm, através de punção venosa na região do antebraço. Os tubos contendo sangue total foram centrifugados a 3500 rotações por minuto

durante 10 minutos, para obtenção das amostras de soro, as quais foram aliquotadas e armazenadas a -20 °C até a realização da análise serológica.

## 2.5 Processamento das amostras

As amostras referentes aos portadores, colhidas em zaragatoas foram diretamente inoculadas nos meios de cultura Gelose Columbia + 5% de sangue de Carneiro (COS) e Gelose Chapman 2 (MSA2) ( bioMérieux®) e incubadas em aerobiose a 37°C durante 18-24 horas.

## 2.6 Caracterização fenotípica

No grupo dos doentes, obtiveram-se isolados bacterianos de produtos biológicos positivos para *S. aureus* de origem diversa: expetoração, aspirados brônquicos e traqueobrônquicos, urina, cateter intravascular, pús de feridas, hemoculturas, exsudados de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas. As estirpes foram cedidas pelo Setor de Microbiologia após identificação. Foi efetuada uma repicagem para gelose de sangue (COS) seguida de incubação de 18 a 24 horas, a 37 °C. Após incubação as estirpes foram conservadas, inoculando o meio de caldo de Trypticase de Soja com glicerol 15%, conservado a -70 °C.

Relativamente aos portadores, para identificação dos microrganismos isolados, analisaram-se as características culturais das colónias que cresceram em COS , relativamente à produção de hemolisina e pigmentos. Em MSA2, também conhecido por meio de gelose manitol salgado, observou-se se existia ou não fermentação do manitol. Posteriormente, foi efetuada a coloração de Gram. As lâminas coradas foram analisadas por microscopia de fundo claro e com objetiva de imersão (1000 X) (Leica DM, 2000). De acordo com estes resultados, foram efetuados testes serológicos para confirmar identificação.



## 2.7 Identificação dos isolados bacterianos

### 2.7.1 Identificação de *S. aureus*

A identificação de *S. aureus* foi efetuada utilizando o kit PASTOREX<sup>TM</sup> STAPH-PLUS (BIO-RAD, Lote 1C2504), que é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex a partir do meio de isolamento. Foram utilizadas culturas frescas e puras. Homogeneizou-se bem o reagente de látex, colocou-se uma gota em dois círculos do card, num adicionou-se uma gota do controlo negativo e no outro 1 a 3 colónias isoladas. Homogeneizou-se suavemente em movimentos circulares e leu-se nos 30 segundos seguintes. No controlo negativo não se observou qualquer tipo de aglutinação. Nas amostras positivas, observou-se formação de agregados.

Este teste permite a deteção simultânea do fator de afinidade para o fibrinogénio, também conhecido como coagulase unida ao “Clumping fator”, da proteína A, que apresenta afinidade pelo fragmento cristalizável das gamaglobulinas (IgG) e de um antígeno capsular específico de *S. aureus*. A combinação de fibrinogénio, IgG e anticorpos monoclonais anticapsulares no mesmo reagente, permite detetar tanto as estirpes muito encapsuladas do *S. aureus* como as pouco encapsuladas. No caso de estirpes muito encapsuladas, são os anticorpos monoclonais anticapsulares que aglutinam a bactéria. Nas estirpes que perderam a cápsula, a aglutinação ocorre através do fibrinogénio e das IgG.

### 2.7.2 Prova da Catalase

O teste da catalase foi efetuado segundo o procedimento operativo da instituição. Colocou-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% numa lâmina de vidro. Em seguida, com ajuda de uma ansa ou com um palito transferiu-se uma colónia para uma lâmina e observou-se imediatamente se existiu formação de bolhas (reação positiva) ou não. A catalase atua sobre o peróxido de oxigénio ( $H_2O_2$ ) desdobrando-o em oxigénio e água.

Em aerobiose, as bactérias utilizam normalmente o oxigénio como aceitador final de eletrões pela via oxidativa (fosforilação oxidativa). O peróxido de hidrogénio acumula-se

nas células, sendo letal para as bactérias se não for imediatamente degradado pela enzima catalase (Murray, *et al.*, 2007).

### 2.7.3 Identificação de MRSA

Para a identificação de MRSA utilizou-se o kit SLIDEX® MRSA *Detection* (bioMérieux®, Lote:1000290270). Este método baseia em detetar o gene que codifica a resistência à meticilina (*mec A*) ou o seu produto de expressão, a proteína PBP2a. O SLIDEX® MRSA *Detection* é um teste rápido de aglutinação de partículas de látex que permite a deteção da resistência à meticilina das estirpes de *S. aureus* através da deteção da PBP2a para diagnóstico, vigilância epidemiológica e investigação. As partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal dirigido contra a PBP2a vão reagir após extração, especificamente com os MRSA, observando-se aglutinação, visível a olho nú. As estirpes de *S. aureus* sensíveis à meticilina não aglutinam as partículas de látex

Para a extração da PBP2a colocaram-se quatro gotas do Reagente de Extração 1 (R3) num tubo de micro-centrífuga. Em seguida, encheram-se completamente o interior de duas ansas de microbiologia estéreis de 1,5 µl com colónias isoladas, retirando-se o excedente esfregando a ansa na superfície do meio de cultura. Colocou-se cada ansa cheia de bactérias no tubo para micro-centrífuga contendo o reagente R3 e homogeneizou-se vigorosamente no vórtex até que as colónias se soltem da ansa. Colocou-se o tubo num bloco de aquecimento a 100°C durante 3 minutos. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e adicionou-se uma gota do Reagente de Extração 2 (R4), homogeneizou-se e centrifugou-se a 1500 g durante 5 minutos. Utilizou-se o sobrenadante como amostra.

Para a aglutinação do látex escolheram-se e marcaram-se dois círculos da carta por amostra, um para testar o látex sensibilizado (R1) e o outro para testar o látex controlo negativo (R2). Adicionou-se uma gota de R1 no círculo teste e em seguida, colocaram-se 50 µl de amostra. Homogeneizou-se utilizando um palito e distribuindo toda a mistura à superfície do círculo, sempre tendo o cuidado de pipetar os reagentes com os frascos contagotas verticalmente. Do mesmo modo, repetiu-se este passo para o reagente R2. Rodou-se

manualmente a carta durante aproximadamente 3 minutos e em seguida observou-se o aparecimento de eventual aglutinação.

Os resultados são expressos da seguinte forma:

Tabela 2.1 Interpretação de resultados segundo facto de ser MRSA ou não

Aglutinação com o látex sensibilizado (R1) e nenhuma aglutinação com o látex controlo negativo (R2)	<b>Presença de PBP2a – Teste Positivo – Presença de MRSA</b>
Sem aglutinação ou muito fraca aglutinação com um e outro dos reagentes de látex	<b>Ausência de PBP2a – Teste Negativo – Presença de MSSA</b>
Aglutinação com o látex controlo negativo (R2)	<b>Ininterpretável</b>

## 2.7.4 Coloração de Gram

As células usadas para a coloração foram retiradas de uma cultura jovem (menos de 24 horas) crescida em meio sólido. Colocou-se sobre a lâmina uma gota da suspensão microbiana e estendeu-se em esfregaço fino. Em seguida, secou e fixou-se com metanol. Cobriu-se o esfregaço com o primeiro corante, Violeta de Cristal durante cerca de 10-30 segundos e passou-se por água corrente. Adicionou-se o lugol durante 20-60 segundos e passou-se por água corrente. Adicionou-se o descorante (álcool-acetona) e atuou durante 10-30 segundos. Passou-se novamente por água corrente. Por fim, colocou-se o segundo corante, Fucsina Básica, durante 30-60 segundos, passou-se por água corrente e deixou-se secar ao ar. Analisou-se através de microscopia de fundo claro, com ampliação de 1000X (Leica DM 2000). Este procedimento está descrito no KIT Gram Stain® (Salubris, Inc; Lote: MB11-0094).

## 2.8 Produção de toxinas estafilocócicas

Utilizou-se o Kit SET-RPLA de detecção de toxinas estafilocócicas A, B, C, D (Oxoid; Lote: 51103) e o Kit TST-RPLA para detecção de TSST-1 (Oxoid; Lote: 23103).

A técnica de aglutinação passiva de látex invertida, ou RPLA, permite a detecção de antígeno solúvel, como toxinas bacteriológicas num ensaio de aglutinação. Num ensaio de aglutinação normal, o anticorpo solúvel reage com um antígeno particulado, como por exemplo células bacterianas. Contudo, num ensaio de aglutinação invertida, o anticorpo, que está ligado a partículas, reage com o antígeno solúvel. As partículas (neste caso o látex) não desempenham por si só uma função na reação e por isso são passivas. A ligação cruzada das partículas de látex, provocada pela reação específica antígeno/anticorpo, resulta numa reação visível de aglutinação de látex. As partículas de látex de poliestireno são sensibilizadas com antissoro purificado extraído de coelhos, individualmente imunizados com as enterotoxinas A, B, C, D e TSST-1. Estas partículas aglutinam-se na presença da enterotoxina correspondente.

Inoculou-se o meio de tripticase de soja que foi incubado na estufa a 37°C durante 24 horas. Após o crescimento centrifugou-se a 900 g durante 20 minutos. Utilizaram-se placas para microtítulos para efetuar as diluições.

### 2.8.1 Detecção de enterotoxinas A, B, C e D

A placa foi organizada para que cada fila consistisse de oito poços. Para cada amostra foram usadas cinco filas. Pipetou-se 25 µl de diluente em cada poço dessas filas exceto no primeiro poço de cada fila e em seguida adicionou-se 25 µl de amostra ao primeiro e segundo poço de cada fila. As diluições sucessivas iniciaram-se no segundo poço de cada fila; pipetou-se 25 µl e efetuaram-se diluições duplas ao longo de cada um das filas, parando no sétimo poço, deixando o último poço apenas com diluente. A cada poço da primeira fila adicionou-se 25 µl de látex sensibilizado com anti-SEA; à segunda fila adicionou-se 25 µl de látex sensibilizado com anti-SEB; à terceira e à quarta fila adicionou-se 25 µl de látex sensibilizado com anti-SEC e D respetivamente por último à

quinta fila adicionou-se 25 µl de controlo de látex, homogenizou-se o conteúdo da placa utilizando um agitador; em seguida, cobriu-se a placa para evitar evaporação e incubou-se à temperatura ambiente durante 24 horas. Efetuou-se então a leitura, colocando a placa contra um fundo escuro para facilitar leitura. O teste foi considerado positivo quando se observou aglutinação distribuída pelas paredes do fundo do poço. O teste foi considerado negativo quando se observou um botão de bactérias no centro do poço.

### **2.8.2 Detecção de TSST-1**

A placa foi organizada para que, cada fila consistisse de oito poços. Para cada amostra foram utilizadas duas filas. Pipetou-se 25 µl de diluente em cada poço dessas filas exceto no primeiro poço de cada fila e em seguida adicionou-se 25 µl de amostra ao primeiro e segundo poço de cada fila. As diluições sucessivas iniciaram-se no segundo poço de cada fila, pipetou-se 25 µl e efetuaram-se diluições duplas ao longo de cada um das filas, parando no sétimo poço, deixando o último poço apenas com diluente. A cada poço da primeira fila adicionou-se 25 µl de látex sensibilizado com a toxina TSST-1; à segunda fila adicionou-se 25 µl de controlo de látex a cada poço; homogenizou-se o conteúdo da placa utilizando um agitador, cobriu-se a placa para evitar evaporação e incubou-se à temperatura ambiente durante 24 horas. Efetuou-se então a leitura, colocando a placa contra um fundo escuro para facilitar leitura. O teste foi considerado positivo quando se observou aglutinação distribuída pelas paredes do fundo do poço. O teste foi considerado negativo quando se observou um botão de bactérias no centro do poço.

## 2.9 Determinação de IgE específica para uma mistura de alergénios inalantes, IgE total e IgE antienterotoxinas

A determinação da concentração de IgE específica para uma mistura de alergénios inalantes (Phadiatop®), IgE total e IgE específica antienterotoxinas no soro, nomeadamente das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e TSST utilizando, phad (Lote:610CM), a\_IgE (Lote: BJNJS) e m80 (Lote:BDG10), m81 (Lote: BDD17), m223 (Lote: BTS0B) e m226 (Lote: C0X08) respetivamente, foi realizada no sistema ImmunoCAP 250® Phadia que consiste num sistema de acesso randomizado contínuo, que realiza todas as etapas do ensaio pelo método imunofluorenzimático (FEIA). O alergénio acoplado covalentemente ao ImmunoCAP (fase sólida) reagiu com as imunoglobulinas específicas da amostra de soro do doente e portadores, seguindo-se lavagem das imunoglobulinas não específicas e posterior adição de anticorpos contra a IgE marcados enzimaticamente com  $\beta$ -Galactosidase, para a formação de complexos. Após incubação, a enzima não ligada foi lavada, procedendo-se à incubação do complexo ligado com o substrato. Após paragem da reação, mediu-se a fluorescência do eluído. Quanto mais elevado o valor da resposta, maior a presença de IgE na amostra. Para avaliar os resultados do ensaio, a resposta das amostras dos doentes foi convertida em concentração através da utilização de uma curva de calibração obtida a partir de calibradores aferidos ao “2nd International Reference Preparation 75/502 of Human Serum Immunoglobulin E” da Organização Mundial de Saúde.

### 2.9.1 Determinação de IgE específica para uma mistura de alergénios inalantes (*Phadiatop*®)

Para a determinação de IgE específicas para uma mistura de alergénios inalantes (*Phadiatop*®) utilizou-se como valor limiar 0,35 kU/l. Valores superiores a 0,35 kU/l são considerados como resultados positivos. Um resultado positivo indica a presença de anticorpos IgE específicos para um ou mais dos alergénios acoplados ao multialergénio. A reavaliação com alergénios simples é recomendada quando há necessidade de identificar o(os) alergénios específico(s) e obter um resultado quantitativo. Um resultado negativo

traduz ausência ou níveis infetáveis de anticorpos IgE específicos para a mistura de alérgenos acoplados ao Phadiatop. A classificação e interpretação dos resultados obtidos com o *Phadiatop* não podem ser comparadas com os resultados de um alérgeno simples. O grau de positividade do *Phadiatop* não pode ser considerado como o grau de positividade cumulativa dos respetivos alérgenos simples. Uma análise de *Phadiatop* positivo, em conjunto com os fatores clínicos e com a história familiar, são determinantes de atopia.

### 2.9.2 Determinação de IgE Total

Permite avaliar o valor de IgE total circulante na amostra, que se encontra elevado na maior parte dos doentes com doença alérgica. O aumento do valor de IgE total na infância é bastante lento, os valores do adulto são atingidos apenas entre os 15 e os 20 anos.

A curva de calibração abrange os valores 2-5000 kU/L. O ensaio foi verificado pela utilização de controlo de qualidade interno.

### 2.9.3 Determinação de IgE específica anti-SE

A determinação da concentração de IgE específica anti-SE no soro, nomeadamente das SE A, B, C e TSST foi efetuada utilizando, m80, m81, m223 e m226. O alérgeno de interesse encontra-se acoplado covalentemente ao ImmunoCAP (fase sólida).

A curva de calibração abrange os valores 0,35-100 kUA/L, onde A representa os anticorpos específicos do alérgeno em estudo. Os valores são também apresentados em classes de concentração, o que facilita a estratificação do grau de risco de anafilaxia e a monitorização da terapêutica (Tabela 2.2). O ensaio foi verificado pela utilização de controlo de qualidade interno.

É importante referir que a concentração de IgE específica anti-SED não foi determinada devido à impossibilidade de encontrar comercializado o reagente (fase sólida) para o equipamento em questão, ImmunoCAP 250® Phadia.

Tabela 2.2- Concentrações de IgE específica e estratificação do grau de risco de anafilaxia (retirada de [www.phadia.com/pt](http://www.phadia.com/pt))

<b>Concentração de IgE específica (kUA/L)</b>	<b>Estratificação do grau de risco de anafilaxia</b>
<0.35	Ausente ou indetetável
0.35-0.6 1	Baixo
0,7-3,4	Moderado
3,5-17,4	Elevado
17,5-49	Muito elevado
50-100	Muito elevado
>100	Muito elevado

## 2.10 Tratamento Estatístico

Os dados foram tratados informaticamente, recorrendo ao programa de tratamento estatístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS), na versão 19.0 de 2011.

Para sistematizar a informação fornecida pelos dados recorreu-se a técnicas da estatística descritiva e da estatística inferencial, nomeadamente, frequências (absolutas e percentuais), medidas de tendência central (média aritmética e mediana), medidas de dispersão e variabilidade (desvio padrão, valor mínimo e valor máximo) e testes estatísticos (teste U de Mann-Whitney, teste do Qui-quadrado e teste exato de Fisher, teste de diferença de proporções testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov como testes de normalidade).

A opção pelos testes não paramétricos atrás referidos justificou-se pela natureza qualitativa das variáveis envolvidas no estudo, pela situação em que foram utilizadas e tendo em atenção as considerações apresentadas por Pestana e Gageiro (2005). A variável IgE total, apesar de ser quantitativa, não apresentou distribuição normal ( $p < 0.050$ ) como é evidente pelos resultados dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Este facto levou, também, a optar por teste não paramétrico na comparação dos resultados entre grupos.



Nos testes considerou-se o valor 0.050 como valor máximo da probabilidade do erro tipo I, ou seja, como valor abaixo do qual se considerou que as relações ou diferenças em estudo eram estatisticamente significativas (Pestana e Gageiro, 2005, Maroco, 2007).

### **III - Resultados e Discussão**

### 3.1 Caracterização da amostra

Neste trabalho foram estudados 47 doentes e 74 profissionais de saúde. No grupo dos doentes, a maioria (57.4%) dos indivíduos era do sexo masculino (Figura 3.1). Relativamente aos profissionais de saúde, a maioria (70.3%) era do sexo feminino (Figura 3.1).

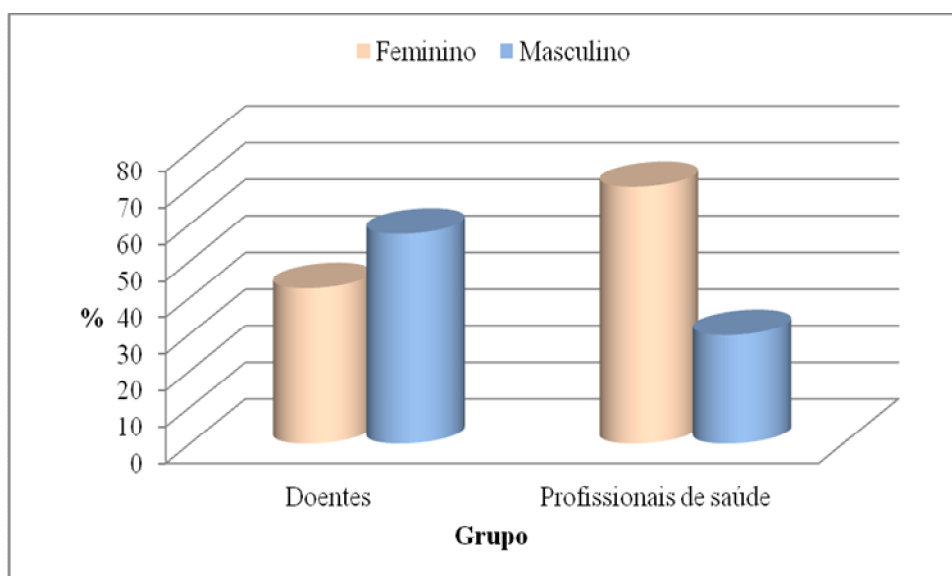


Figura 3.1 - Elementos da amostra segundo o sexo

No que respeita à idade, verificou-se que os doentes tinham entre 46 e 91 anos, sendo a idade média 75 anos. Observou-se que 42.6% dos doentes tinham, pelo menos, 80 anos e 31.9% que tinham entre 70 e 79 anos (Figura 3.2).

Para os profissionais de saúde observou-se um intervalo de idades compreendido entre 21 e 56 anos, sendo a média 39 anos. Constou-se, também, que 39.2% tinham entre 40 e 49 anos, seguidos de 27.0% que pertenciam ao grupo etário dos 30 aos 39 anos e de 24.3% que tinham menos de 30 anos (Figura 3.2).

Os resultados mostram que a idade pode ser considerada um fator de risco para contrair infecção. A debilidade física e imunológica associada a idades mais avançadas, não esquecendo a componente social que, por vezes, compromete uma higienização adequada assim como, a hospitalização frequente com recurso à utilização de manobras invasivas (como por exemplo, sondas nasais, nasogástricas, urinárias, cateteres endovenosos) e o uso de frequente de antimicrobianos explicam esta tendência. Também Huang e Platt (2003) relataram nos seus estudos valores semelhantes, em 57% dos doentes do sexo masculino apresentavam idade média de 68 anos.

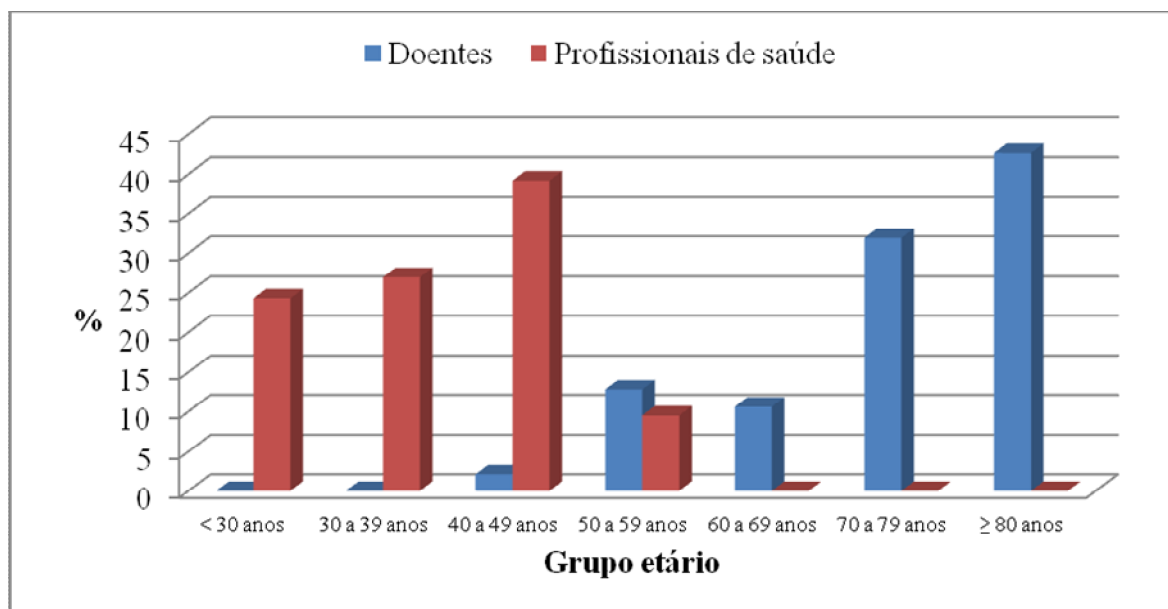


Figura 3.2 Elementos da amostra em função do grupo etário

No que respeita à proveniência das amostras, constatou-se que 53.2% dos doentes pertenciam ao serviço de Medicina, seguidos de 19.1% que estavam na Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) e de 12.8% que estavam no serviço de Pneumologia. No grupo dos profissionais de saúde, 25.7% trabalhavam no serviço de Pneumologia, seguindo-se 14.9% que pertenciam à UCI e 13.5% que desempenhavam funções nas Urgências ou no serviço de Raio-X (Figura 3.3).

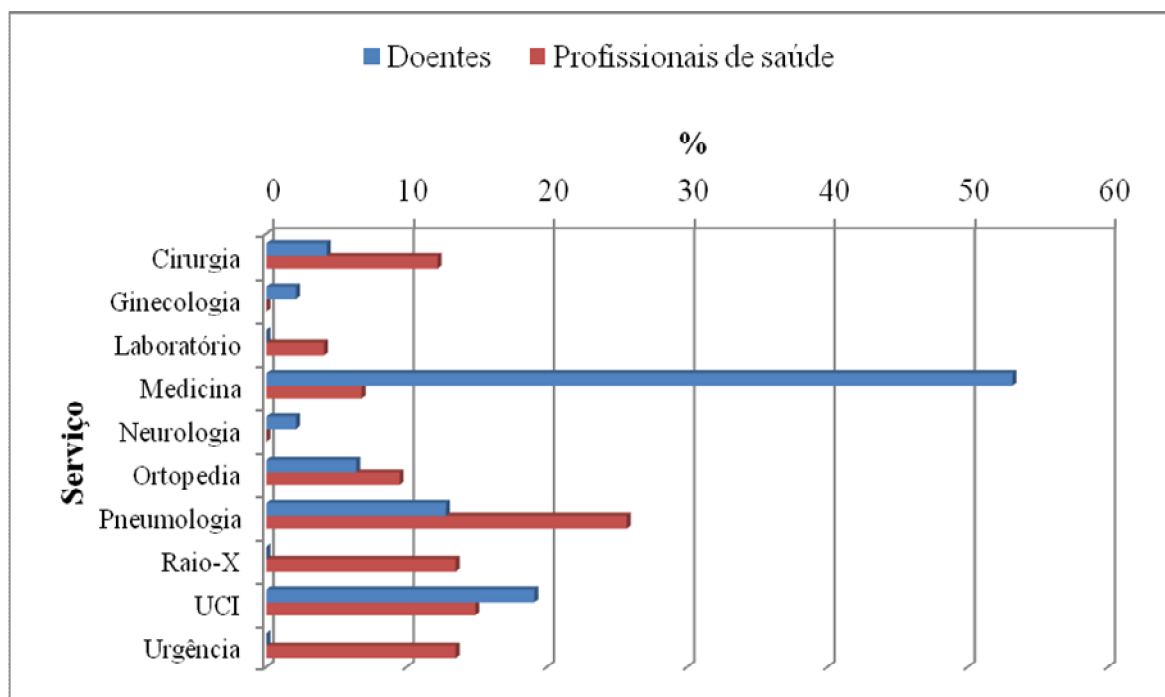


Figura 3.3 - Elementos da amostra segundo o serviço

No que se refere ao produto biológico verificou-se que, no grupo dos doentes, em 25.5% dos casos foi utilizada expectoração, seguida do aspirado traqueobrônquico (21.3%) e da hemocultura (19.1%), como se verifica na Tabela 3.1. Os produtos respiratórios foram os mais comuns ao longo do estudo. Estes resultados, poderão estar associados ao facto de o período de colheitas das amostras ter sido realizado essencialmente, nos meses de inverno e primavera, exatamente quando existem mais infeções respiratórias associadas ao *S. aureus*, devido à morbilidade associada às condições climáticas desta época do ano.

Num estudo realizado por Monnet e colaboradores (2004) é referida a existência de uma variação sazonal da prevalência de MRSA associada à primavera, altura em que a mucosa nasal se encontra mais vulnerável devido a diversos fatores, incluindo a polinização. Uma vez colonizadas as fossas nasais, o microrganismo pode facilmente disseminar-se através das mãos a outras partes do organismo provocando infeções graves como bacteremia ou endocardite (Monnet, *et al.*, 2004; Santos, *et al.*, 2007).

Tabela 3.1 Elementos da amostra segundo o produto biológico

(Não Aplicável – NA)

Produto biológico	Grupo	Doentes	Profissionais de saúde
Exsudado nasal	n	-	74
	%	0.0	100.00
Exsudado de ferida não cirúrgica	n	4	NA
	%	8.5	NA
Expetoração	n	12	NA
	%	25.5	NA
Hemocultura	n	9	NA
	%	19.1	NA
Urina	n	7	NA
	%	14.9	NA
Aspirado traqueobrônquico	n	10	NA
	%	21.3	NA
Aspirado brônquico	n	1	NA
	%	2.1	NA
Pus	n	2	NA
	%	4.3	NA
Cateter intravascular	n	1	NA
	%	2.1	NA
Exsudado de ferida cirúrgica	n	1	NA
	%	2.1	NA
Total	n	47	74
	%	100.0	100.0

Num estudo de infeções hospitalares que englobou todas as regiões de França efetuado pelo INVS (INVS, 2006), verificou-se que de entre os microrganismos isolados nas infeções respiratórias, *S. aureus* foi um dos agentes microbiológicos mais identificados com uma percentagem de 18,7%, apenas ultrapassado por *Pseudomonas aeruginosa* (20,6%). Quanto às hemoculturas, o facto de a percentagem ser mais baixa é um bom indicador de infeção reduzida, visto que se trata de infeção no sangue que pode ser adquirida no hospital como consequência de uma infeção adquirida noutro local anatómico que se generalizou ao sangue (Laupland, *et al.*, 2008). No estudo do INVS (2006), verificou-se que os microrganismos isolados nas hemoculturas, *Staphylococcus coagulase* negativo e *S. aureus* com as percentagens de 16,8% e 16,3%, respetivamente, foram os microrganismos predominantes neste produto.

No grupo dos profissionais de saúde, em todos os casos foi analisado o exsudado nasal, procedimento de eleição para fins epidemiológicos na detecção de portadores de MRSA, tal como se encontra descrito no Programa Nacional de Controle de Infecção (PNCI, 2004). Alguns estudos mostraram que a cavidade nasal é o local de maior aderência do microrganismo (Moura, *et al.*, 2011).

Cerca de três em cada quatro profissionais de saúde, 27.0%, eram portadores de MRSA (Figura 3.4).

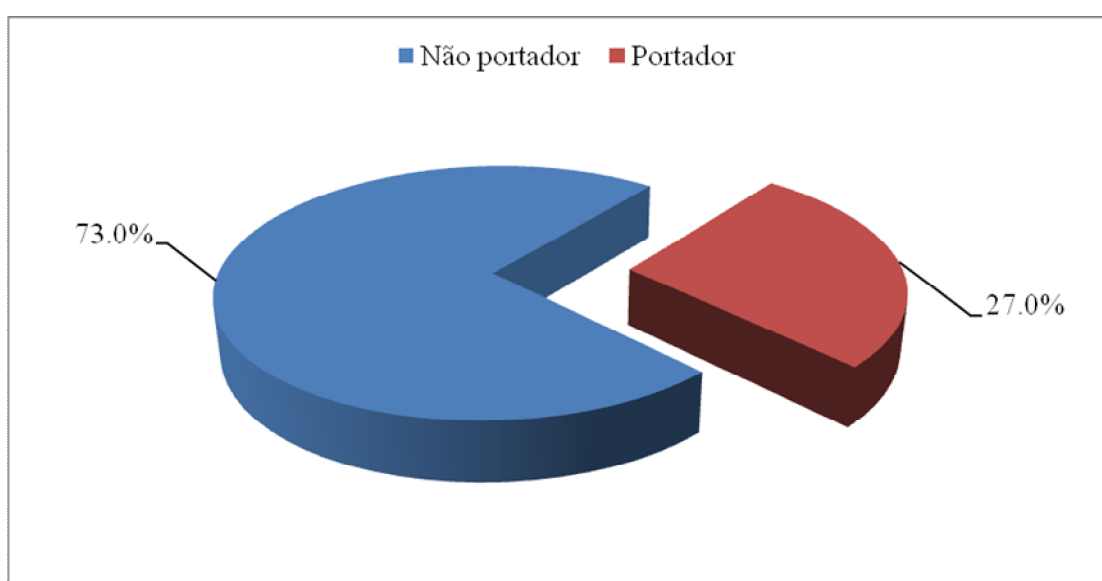


Figura 3.4 - Profissionais de saúde portadores e não portadores de MRSA

Os portadores pertenciam essencialmente ao serviço de Urgência, UCI e Raio X. Estes serviços apresentam doentes com infecção de origem diversificada. Os resultados obtidos neste estudo mostram que é necessária uma maior adesão destes profissionais às medidas de prevenção padrão como, por exemplo, a higienização das mãos, muitas vezes negligenciada, por vários motivos, entre eles, situações de prestação de cuidados urgentes, sobrecarga de trabalho, condições inadequadas de infraestruturas, entre outras. A erradicação do microrganismo continua a ser o principal objetivo da Comissão de Infecção dos Hospitais. Os estudos de Eiff e os seus colaboradores (2001) mostraram que, a eliminação de portadores nasais reduz significativamente a incidência de infecção por *S. aureus*. Mostraram também, que profissionais de saúde apresentam taxas de colonização

superiores quando comparados com a população em geral, uma vez que, se encontram expostos continuamente no seu trabalho a estes microrganismos (Eiff, *et al.*, 2001).

Em todas as amostras estudadas, houve concordância fenotípica entre as diferentes metodologias utilizadas. Todas as colônias suspeitas de serem *S. aureus*, isoladas a partir do meio de cultura COS, foram positivas nos testes serológicos para detecção da PBP2a, bem como, nos testes para detecção do fator de afinidade para o fibrinogénio e proteína A. Por outro lado, todos os isolados obtiveram uma MIC igual ou superior a 4 µg/ml para a oxacilina.

### 3.2 Produção de toxinas em doentes e em portadores

Os resultados mostraram que a proporção de produtores de toxinas foi de 76.6% nos doentes e de 65.0% nos portadores, não sendo significativa a diferença entre os dois grupos ( $p = 0.327$ ) (Figura 3.5).

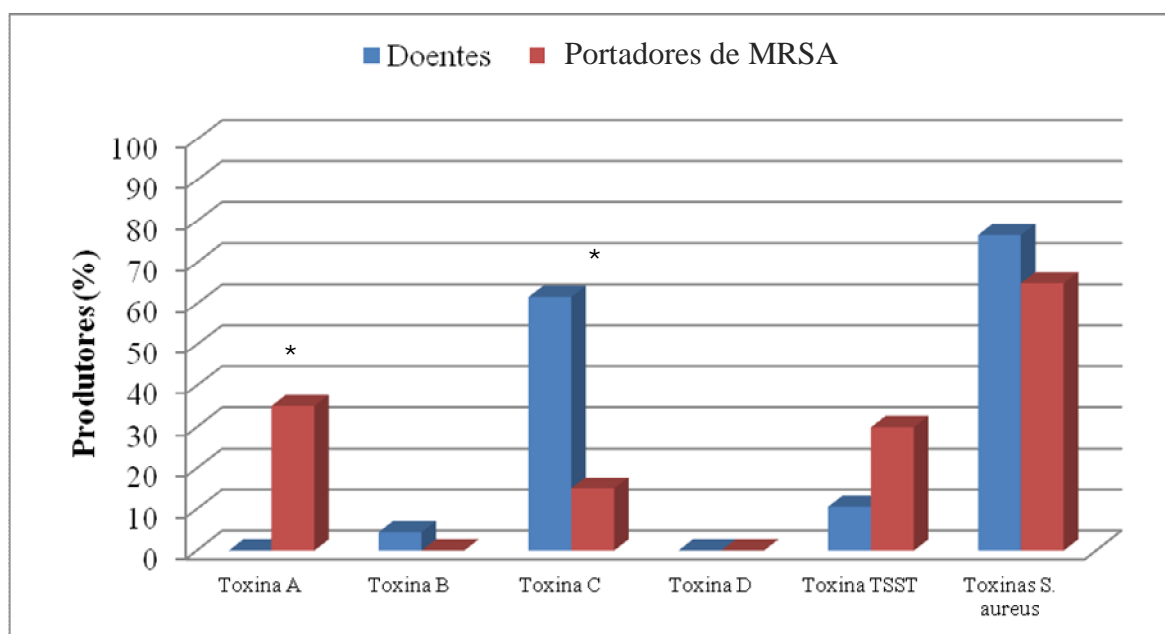


Figura 3.5 - Produção de toxinas do *S. aureus* em doentes e em portadores de MRSA (\* $p < 0,05$ )



Estes resultados são concordantes com outros descritos na literatura. De facto, está descrito que nos indivíduos doentes encontram-se alterações mais graves a nível das mucosas o que facilita a entrada e propagação do microrganismo, que faz dos tecidos do hospedeiro um local com as condições adequadas para se multiplicar, produzindo diversos produtos tóxicos que funcionam como escape à resposta imunitária (Dinges, *et al.*, 2000).

Verificou-se que nenhum dos doentes produziram SEA do *S. aureus*, mas no grupo dos profissionais a percentagem de indivíduos produtores desta toxina foi de 65.0%. A aplicação do teste exato de Fisher revelou que a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ), ou seja, a proporção de portadores de MRSA produtores desta toxina foi significativamente superior à dos doentes (Figura 3.5).

Um estudo realizado por Kissner e colaboradores (2010), refere que a toxina A apresenta uma atividade tóxica mais potente do que as restantes toxinas e que, este facto é potencializado pelo componente lipopolissacarídeo. A associação da toxina com este componente, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias que por sua vez, aumentam a gravidade da infeção. Pinchuk *et al* (2010) mostraram que a maioria das estirpes MRSA produz toxina A, para além de poderem produzir ainda toxina B, D e TSST-1. Neste estudo verificou-se que, as estirpes de MRSA colonizadoras de indivíduos portadores produzem maioritariamente toxina A. Estes resultados vão de encontro a outros estudos, incluindo os mais antigos, em que Casman *et al* (1967), ao estudar 144 estirpes de *S. aureus* isolados da cavidade nasal, verificou que 45 delas eram produtoras de SE e destas 7,6% produziam toxina A. Estas diferenças na produção de toxinas podem ser explicadas devido à utilização de diferentes técnicas de deteção mas também, a variações geográficas e genéticas que o microrganismo vai adquirindo (Kissner, *et al.*, 2010). Assim, pode afirmar-se que as estirpes de *S. aureus* que colonizam os profissionais de saúde do Hospital Sousa Martins produzem essencialmente toxina A.

No que concerne à SEB, constatou-se que no grupo dos doentes a percentagem de não produtores foi de 95.7% e que nenhuma das estirpes isoladas de portadores produziu a toxina, não sendo, no entanto, significativa a diferença observada ( $p = 1.000$ ) (Figura 3.5). Apenas dois doentes produziram esta toxina e os produtos biológicos onde foi identificada foram expetoração e pus. De acordo com Pinchuk e colaboradores (2010), a exposição a esta toxina provoca dificuldade em respirar, dores musculares intensas, febre alta, edema

pulmonar, entre outras infeções respiratórias graves e ainda, choque tóxico, algumas horas após exposição. É considerada como uma nova arma biológica e os seus efeitos têm sido testados em laboratório, através da utilização de animais que são expostos a aerossóis que contém a toxina e rapidamente desenvolvem sintomas como edema pulmonar e choque tóxico.

A maioria dos doentes, 61.7%, produziu SEC do *S. aureus*, enquanto que, no grupo dos portadores a situação foi inversa, ou seja, a maioria (85.0%) não produziu esta toxina. A aplicação do teste do exato de Fisher revelou que a diferença é estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) o que indica que nos doentes a produção de toxina é significativamente superior à observada no grupo dos portadores de MRSA (Figura 3.5). Relativamente a esta toxina, alguns estudos sugerem que a sua produção está associada ao uso de ventiladores, que é produzida essencialmente por estirpes de MRSA que habitualmente colonizam a pele e que, se encontram associadas a infeções pós-cirúrgicas (Al-Wali, *et al.*, 1998; Dinges, *et al.*, 2000). Verificou-se que os produtos biológicos onde esta toxina foi identificada com mais frequência, foram exatamente os produtos respiratórios, o que pode ser resultado da contaminação de ventiladores por *S. aureus* ou contaminação através de contacto direto com outros indivíduos infetados.

A SED, não foi produzida por nenhum dos doentes, nem por nenhum dos profissionais (Figura 3.5). Estes resultados sugerem “bom prognóstico”, uma vez que, uma pequena quantidade desta toxina é suficiente para desencadear infeção grave como defende Pinchuk e colaboradores (2010). Este comportamento pode ser explicado pelo facto de existirem múltiplos locais de ligação ao complexo MHC classe II que este superantigénio apresenta, ativando uma maior quantidade de células T capazes de induzir produção de citocinas agravando a sintomatologia.

Quanto à toxina TSST-1 do *S. aureus*, constatou-se que a maioria dos elementos de ambos os grupos não era produtor, sendo as percentagens de 8.94% para os doentes e de 27.0% para os portadores. O teste exato de Fisher revelou que a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.072$ ) (Figura 3.5). Contudo, observa-se uma ligeira diferença, ou seja, indivíduos portadores de MRSA apresentam uma maior produção desta toxina do que indivíduos doentes, tal como observado noutros estudos realizados anteriormente. Um estudo desenvolvido por Al-Wali e colaboradores (1998) mostrou uma elevada produção

de TSST-1 (62%) em indivíduos portadores quando comparados com indivíduos doentes (38%). Este facto pode ser explicado devido à presença do gene *tst* responsável pela produção da toxina TSST-1. Assim, maioria das estirpes de *S. aureus* que colonizam as fossas nasais de profissionais de saúde possuem o gene o *tst*, quando comparadas com as estirpes provenientes dos doentes, o que significa que produzem a toxina TSST-1 em maior quantidade.

É importante referir que no grupo dos portadores, três indivíduos encontravam-se colonizados por estirpes de MRSA que produziam em simultâneo duas toxinas. Nos três casos, as toxinas produzidas em simultâneo foram a SEA e a TSST-1. Estes resultados são suportados por vários estudos, nomeadamente Hu e colaboradores (2011) que defendem que uma mesma estirpe de *S. aureus* pode produzir uma ou mais toxinas, incluindo SE e TSST-1. Chini *et al* (2006) mostrou que todas as estirpes isoladas de portadores nasais apresentam o gene *se* e/ou *tst*, responsáveis pela produção de SE e TSST-1, respetivamente. Becker e colaboradores (2003) foram mais longe, ao afirmar que a presença de mais de um gene responsável pela produção de toxinas é significativamente mais elevada do que a presença de um só gene para uma só toxina.

Têm sido sugeridas diversas explicações para a variedade de produção de toxinas por parte de *S. aureus*, entre as quais se destaca o estudo de Cenci-Goga *et al* (2003), que mostram que as SE produzidas por isolados de *S. aureus* resultam da origem geográfica do microrganismo e que essas diferenças podem ser reflexo da diversidade dos isolados de *S. aureus* e da sua origem. Estes autores sugerem ainda, que a heterogeneidade das toxinas produzidas se deve a uma seleção genética para a modificação das sequências dos seus aminoácidos, de forma a facilitar a sobrevivência de *S. aureus* no hospedeiro (Cenci-Goga, *et al.*, 2003). É importante referir que estes superantígenos aumentam fortemente o efeito de outros fatores de infeção e ainda, podem induzir a produção de IgE específicas anti-SE.

### 3.3 Produção de IgE específica antienterotoxinas em doentes e profissionais de saúde

Foram considerados indivíduos sensibilizados ao alergénio, aqueles que apresentaram concentrações de IgE específica anti-SE  $\geq 0,35$  kUA/l (Paganelli, *et al.*, 1998, Bodtger, *et al.*, 2006, Wood, *et al.*, 2007, Liu, *et al.*, 2011) (Figura 3.6).

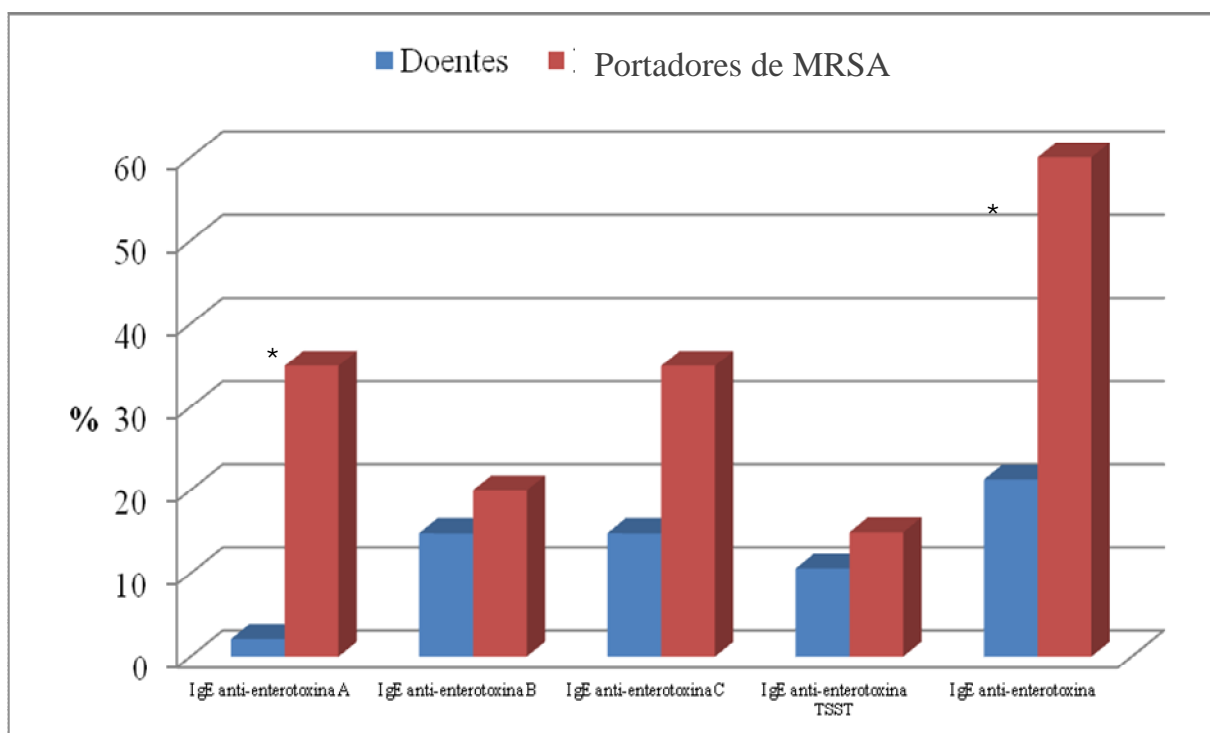


Figura 3.6 – Distribuição da percentagem de indivíduos sensibilizados às diferentes enterotoxinas do *S. aureus* (\* $p < 0,05$ )

A concentração de IgE total no grupo dos doentes situou-se entre 1.35 kUA/l e 654.70 kUA/l, sendo a média 108.67 kUA/l. No grupo dos portadores, observaram-se concentrações compreendidas entre 2.54 kUA/l e 560.00 kUA/l, sendo o seu valor médio 129.22 kUA/l. A aplicação do teste U de Mann-Whitney revelou que a diferença observada não é estatisticamente significativa ( $p = 0.218$ ) pelo que se pode concluir que os dois grupos evidenciam concentrações de IgE total semelhantes (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Elementos da amostra segundo a concentração de IgE total e IgE específica antienterotoxinas do *S. aureus*

Grupo		Doentes	Profissionais de saúde	Teste
IgE total (kUA/l)				
Média		108.67	129.22	U = 380.00 p = 0.218
Mediana		54.40	86.55	
Desvio padrão		155.13	138.28	
Mínimo		1.35	2.54	
Máximo		654.70	560.00	
IgE antienterotoxina A (kUA/l)		Doentes	Profissionais de saúde	Teste
Não produtor (< 0.35)	n	46	13	<b>p = 0.001</b>
	%	97.9	65.0	
Produtor (≥ 0.35)	n	1	7	
	%	2.1	35.0	
IgE antienterotoxina B (kUA/l)		Doentes	Profissionais de saúde	Teste
Não produtor (< 0.35)	n	40	16	p = 0.721
	%	85.1	80.0	
Produtor (≥ 0.35)	n	7	4	
	%	14.9	20.0	
IgE antienterotoxina C (kUA/l)		Doentes	Profissionais de saúde	Teste
Não produtor (< 0.35)	n	40	13	p = 0.051
	%	85.1	65.0	
Produtor (≥ 0.35)	n	7	7	
	%	14.9	35.0	
IgE antienterotoxina TSST (kUA/l)		Doentes	Profissionais de saúde	Teste
Não produtor (< 0.35)	n	42	17	p = 0.687
	%	89.4	85.0	
Produtor (≥ 0.35)	n	5	3	
	%	10.6	15.0	
Não produtor	n	37	8	$\chi^2 = 9.539$ <b>p = 0.004</b>
	%	78.7	40.0	
Produtor	n	10	12	
	%	21.3	60.0	

Tal como se verificou em relação à produção de toxinas do *S. aureus*, também não houve diferenças significativas entre doentes e portadores para a produção de IgE total. Sabe-se no entanto, que a concentração de IgE total é significativamente mais baixa em indivíduos com infecção por *S. aureus* e que produzem toxinas do que, em indivíduos que não produzem toxinas. A produção de IgE é uma resposta secundária às enterotoxinas

produzidas pela bactéria. Ao contrário do que seria esperado, concentrações elevadas de toxinas inibem a produção de IgE *in vitro*, por parte de indivíduos saudáveis e de indivíduos doentes. Esta inibição na produção de IgE deve-se provavelmente ao IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , os quais são libertados em resposta a altas, mas não a baixas concentrações de toxinas (Zollner, *et al.*, 2000).

Relativamente à concentração da IgE anti-SEA, verificou-se que 97.9% dos doentes apresentou valores inferiores a 0.35 kUA/l, ou seja, não produziram esta IgE específica. No grupo dos portadores, a percentagem de produtores de IgE específica anti-SEA foi de 65.0%. A análise estatística revelou que a diferença foi estatisticamente significativa ( $p = 0.001$ ) pelo que se concluiu que os doentes apresentavam concentrações de IgE anti-SEA significativamente inferiores às dos portadores. Estudos desenvolvidos por Zollner e colaboradores (2000) defendem que, se as toxinas contribuem para uma inflamação alérgica, é natural que se espere um aumento da produção de IgE específica anti-SE. Este facto foi evidente neste estudo, pois os indivíduos portadores de MRSA e produtores da toxina A produziram também IgE específica anti-SEA. e indivíduos doentes não produziram toxina A, logo não produziram de IgE específica anti-SEA.

No grupo dos doentes a percentagem de casos produtores de IgE anti-SEC situou-se nos 85.1% (Tabela 3.2 e Figura 3.6). No grupo dos portadores a percentagem foi de 65.0%. A diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.051$ ) pelo que se concluiu que os indivíduos dos dois grupos produziram esta IgE específica com a mesma frequência. Este resultado não está de encontro com o esperado, tal como aconteceu com a toxina A e com a IgE específica anti-SEA. Neste caso, existe uma maior produção de toxina C no grupo dos doentes, no entanto não produzem IgE específica anti-SEC em concentrações significativamente mais elevadas. Apenas 5 de 29 indivíduos infetados com *S. aureus* que produziram toxina C, produziram IgE específica anti-SEC. Estes resultados podem ser explicados pelo facto dos indivíduos doentes não apresentarem pré-disposição para produzirem IgE devido à sua idade mais avançada. A produção de anticorpos do tipo IgE tende a diminuir com o aumento da idade (Host, *et al.*, 2003).

A maioria dos elementos de ambos os grupos, respetivamente, 85.1% nos doentes e 80.0% nos portadores, apresentaram concentrações de IgE anti-SEB inferiores a 0.35 kUA/l

(Tabela 3.2 e Figura 3.6), indicando que a produção de IgE anti-SEB foi semelhante nos dois grupos de estudo ( $p = 0.726$ ).

O mesmo se verificou para a concentração de IgE anti-TSST1 nos dois grupos, onde as percentagens de casos nos dois grupos foram muito próximas, com valores inferiores a 0.35 kUA/l, respetivamente, 89.4% e 85.0%. As diferenças não foram estaticamente significativas ( $p = 0.687$ ) (Tabela 3.2 e Figura 3.6).

Em termos globais, constatou-se que a proporção de indivíduos produtores de IgE específica anti-SE foi de 21.3% no grupo dos doentes e de 60.0% no grupo dos portadores (Figura 3.6). A aplicação do teste do Qui-quadrado revelou que a diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0.004$ ) pelo que se concluiu que os profissionais de saúde produzem IgE específicas anti-SE em concentrações mais elevadas do que os doentes.

Sabe-se que a concentração da IgE no soro se altera com a idade, pelo que indivíduos mais jovens têm tendência apresentar concentrações de IgE mais elevadas do que indivíduos de mais idade. Outro fator importante que altera os níveis de IgE no soro é a exposição ao alérgénio (Roitt, *et al.*, 2003). Assim, sugere-se que os indivíduos portadores como se incluem em faixas etárias mais jovens e se encontram expostos por longos períodos de tempo ao alérgénio devido ao seu trabalho, apresentam concentrações de IgE específicas significativamente mais elevadas do que os doentes.

Em relação à prevalência da produção de toxinas em função do produto biológico, verificou-se que no grupo dos doentes a produção de toxinas foi detetada principalmente em pus, cateter intravascular e exsudado de ferida cirúrgica (Tabela 3.3 e Figura 3.7). Apesar de serem apenas duas e uma amostra de cada, respetivamente, todas estavam colonizadas por estirpes de *S. aureus* produtoras de toxinas. No entanto, nenhum destes doentes produziu IgE específica anti-SE. Estes produtos encontram-se descritos na literatura por diversos autores, como umas das principais fontes de *S. aureus*. Solberg (2000), referiu que num estudo realizado com doentes submetidos a cirurgia, em 34% destes 81 doentes foi isolado *S. aureus* na pele e feridas. Estes resultados são um bom exemplo, da transmissão do microrganismo aos profissionais de saúde, que ao manipularem feridas infetadas podem transportar o microrganismo nas suas mãos até três

horas. Contudo, pode ser rapidamente eliminado lavando de imediato as mãos, após contacto com o doente.

Tabela 3.3 - Prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em função do produto biológico em doentes  
(Não Aplicável – NA)

Prevalência de produtores Produto biológico		Toxinas	IgE antienterotoxinas
Exsudado de ferida não cirúrgica	n	3	1
	%	75.0	25.0
Expetoração	n	10	4
	%	83.3	33.3
Hemocultura	n	8	2
	%	88.9	22.2
Urina	n	4	2
	%	57.1	28.6
Aspirado traqueobrônquico	n	6	NA
	%	60.0	NA
Aspirado brônquico	n	1	1
	%	100.0	100.0
Pus	n	2	NA
	%	100.0	NA
Cateter intravascular	n	1	NA
	%	100.0	NA
Exsudado de ferida cirúrgica	n	1	NA
	%	100.0	NA

A hemocultura foi o produto biológico com percentagem mais elevada de produção de toxinas (88.9%), o que pode indicar um elevado grau de invasividade por parte do *S. aureus*, aumentando o risco de bacteremia (Nabera, 2009), patologia que se encontra associada a elevados índices de mortalidade. Um estudo desenvolvido por Nabera (2009) mostrou que a maior parte dos casos de bacteremia são consequência da colonização nasal. É importante referir, que os indivíduos doentes não foram rastreados relativamente ao facto de serem ou não portadores de MRSA na altura da admissão hospitalar. Assim, não se pode afirmar se já eram portadores do microrganismo ou se o adquiriram no ambiente hospitalar.



Apesar de ser apenas um caso, é importante salientar que no aspirado brônquico se verificou a produção de toxinas do *S. aureus* e que esta produção está de acordo com a produção de IgE específica anti-SE (Tabela 3.3 e Figura 3.7). Tem sido sugerido que a produção de toxinas estafilocócicas está diretamente relacionada com presença de IgE específicas anti-SE, com a presença de outro tipo de alérgénio (tanto alimentar como inalante) e com aumento da severidade da doença (Bunikowski, *et al.*, 1998)

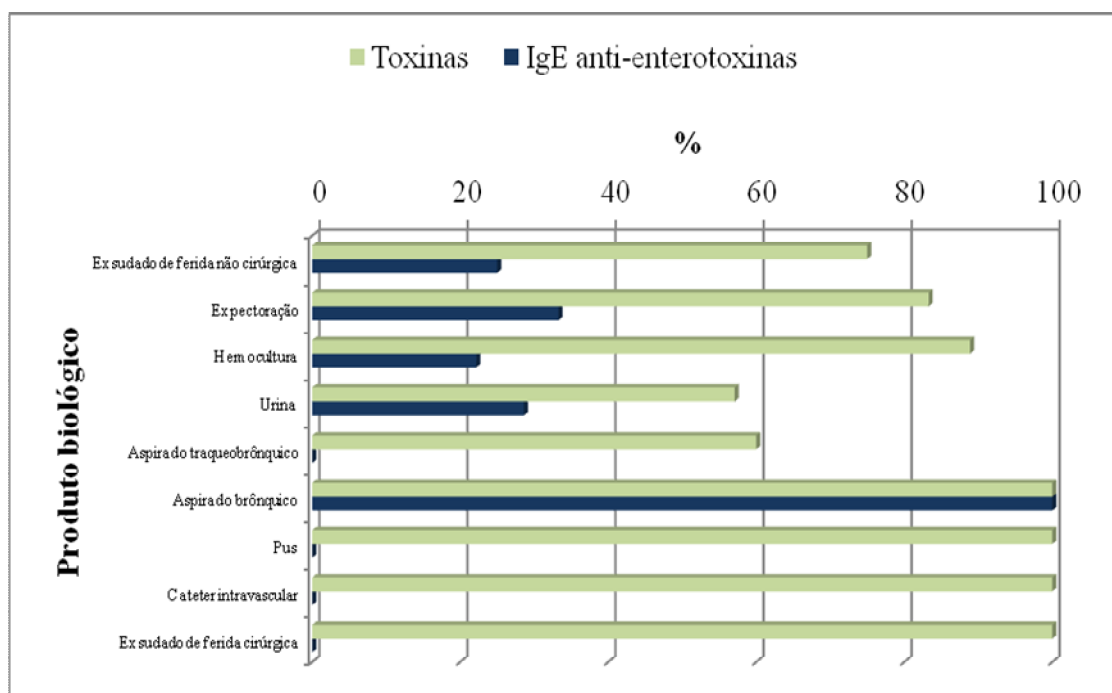


Figura 3.7 - Prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em função do produto biológico em doentes

Relativamente à prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em portadores de MRSA, em função do serviço, realça-se o facto de o grupo dos portadores ser constituído por um total de indivíduos relativamente baixo, sendo arriscado tirar conclusões. No entanto, verificou-se que a prevalência de toxinas é mais elevada em indivíduos que pertencem ao serviço de Medicina, Raio X e Laboratório, pois são serviços onde os profissionais estão expostos a uma variedade de doentes com diferentes focos de infeção (Tabela 3.4 e Figura 3.8). Estes indivíduos produzem também IgE específica anti-SE.

Tabela 3.4 - Prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em função do serviço em portadores de MRSA (Não Aplicável – NA)

Serviço	Prevalência de produtores	Toxinas	IgE antienterotoxinas
Cirurgia	n	1	2
	%	50.0	100.0
Laboratório	n	1	1
	%	100.0	100.0
Medicina	n	2	2
	%	100.0	100.0
Ortopedia	n	1	NA
	%	50.0	NA
Pneumologia	n	2	3
	%	50.0	75.0
Raio-X	n	3	2
	%	100.0	66.7
UCI	n	2	1
	%	50.0	25.0
Urgência	n	1	1
	%	50.0	50.0

No entanto, o serviço a destacar relativamente à produção de IgE específicas anti-SE foi a Pneumologia, onde esta prevalência foi bastante elevada (Tabela 3.4 e Figura 3.8). Embora sejam poucos indivíduos, a prevalência das toxinas neste serviço tenha sido ligeiramente mais baixa do que nos serviços referidos anteriormente, sugere-se que este facto seja devido à presença de uma estirpe colonizadora de *S. aureus* que não produz toxinas. No entanto, o indivíduo podia ter sido colonizado anteriormente por estirpes que produziam toxinas e, encontrar-se ainda, a produzir anticorpos do tipo IgE contra essas toxinas.

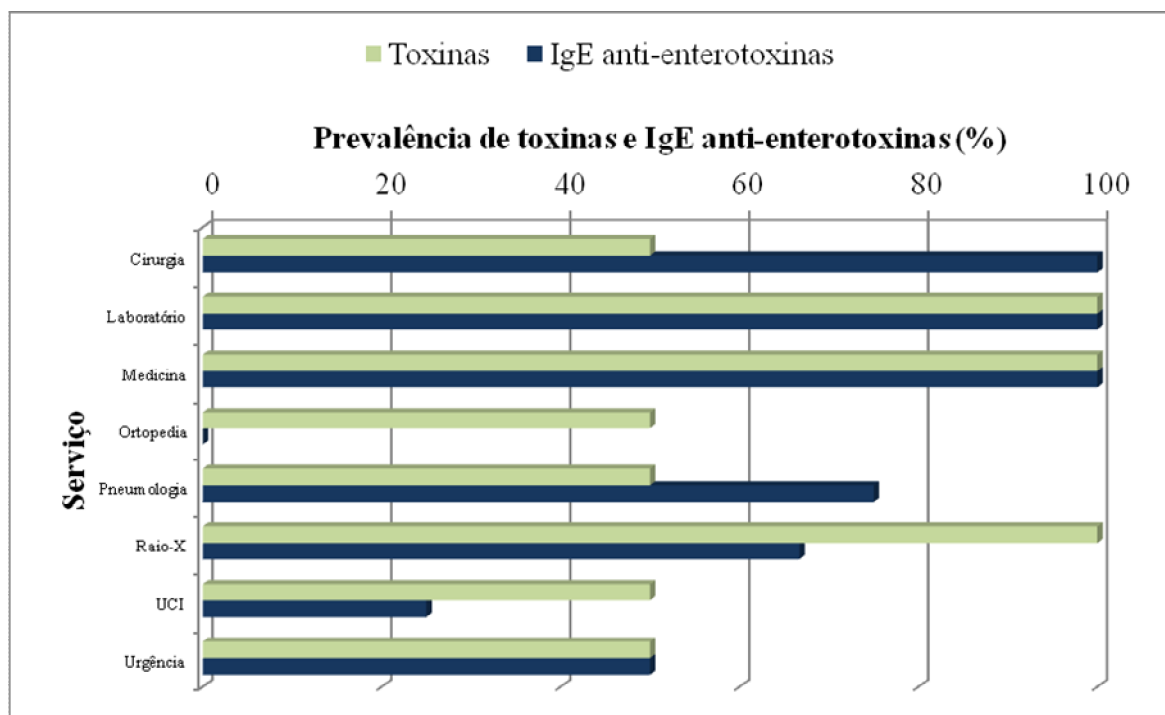


Figura 3.8 - Prevalência da produção de toxinas e de IgE anti-SE em função do serviço em portadores de MRSA

### 3.4 Produção de toxinas e de IgE específica antienterotoxinas nos doentes e portadores

A conjugação dos dados referentes à produção de toxinas e de IgE específica antienterotoxinas permitiu obter os resultados que se encontram apresentados na Tabela 3.5.

Constatou-se que no grupo dos doentes produtores de toxinas (n=36), havia 9 que eram, também, produtores de IgE específica antienterotoxinas, o que corresponde a uma proporção de 25.0%. Em relação à IgE específica anti-SE constatou-se que de 10 indivíduos produtores de IgE, 9 produziam também toxinas, o que equivale a uma percentagem de 90.0% de doentes produtores de IgE específica anti-SE que, também, produzem toxinas.

Tabela 3.5 Produtores de toxinas *versus* produtores de IgE específica anti-SE

Grupo		Doentes	Portadores de MRSA	Teste
Toxinas <i>vs</i> IgE específica anti-SE				
Produtores de toxinas que produzem IgE específica anti-SE	n %	9 25.0	8 61.5	<b>p = 0.018</b>
Produtores de IgE específica anti-SE que produzem toxinas	n %	9 90.0	8 66.7	

No grupo dos portadores de MRSA produtores de toxinas (n=12), 8 indivíduos produziram IgE específica anti-SE, o que corresponde a uma proporção 61.5% de portadores que são produtores de toxinas e que produziram também IgE específica anti-SE. De 11 indivíduos que produziram IgE específica anti-SE, oito (66.7%) produziram simultaneamente toxinas.

A comparação entre os dois grupos revelou que a percentagem de produtores de toxinas que também produzem IgE específica anti-SE foi significativamente superior ( $p = 0.018$ ) nos portadores de MRSA (61.5%), relativamente aos doentes (25.0%). Por outro lado, a diferença na proporção de produtores de IgE específica anti-SE que produziram toxinas não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.194$ ).

Estes resultados sugerem que as estirpes colonizadoras prevalentes no grupo dos portadores possuem genes responsáveis pela produção de uma ou mais toxinas e que este facto, em conjunto com a idade dos indivíduos e a exposição prolongada ao alérgeno, faz com que se produzam também, IgE específica anti-SE.

A produção de toxinas e IgE específica anti-SE normalmente sugere sempre uma associação entre infeção e alergia (Nuñez, *et al.*, 2008).

### 3.5 Identificação de indivíduos atópicos e não atópicos

Para identificar indivíduos atópicos foi determinada a concentração de IgE específica para uma mistura de alergénios inalantes (*Phadiatop*) (Tabela 3.6), que permite determinar a sensibilização atópica a esses alergénios específicos.

Tabela 3.6 Caracterização da amostra segundo a atopia

Grupo IgE específicas para mistura de alergénios inalantes		Doentes	Portadores de MRSA	Teste
Não atópicos	n	36	12	$\chi^2 = 1.902$ $p = 0.236$
	%	76.6	60.0	
Atópicos	n	11	8	
	%	23.4	40.0	

Neste estudo verificou-se que 76.6% dos doentes não são atópicos e que o mesmo ocorreu com 60.0% dos portadores de MRSA. As diferenças observadas entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas ( $p = 0.236$ ) pelo que se pode concluir que, para este parâmetro, os dois grupos são semelhantes.

### 3.6 Produção de IgE específica antienterotoxinas em indivíduos atópicos e não atópicos

Observou-se que 45.5% dos doentes atópicos produziram IgE específica anti-SE (Tabela 3.7). Nos doentes não atópicos a proporção de produtores de IgE situou-se nos 13.9%. Estas proporções são significativamente diferentes ( $p = 0.025$ ) pelo que pode afirmar-se que nos doentes atópicos a percentagem de produtores de IgE específica anti-SE foi superior à mesma percentagem nos doentes não atópicos.

Para os portadores de MRSA verificou-se que a proporção de atópicos que produziram IgE específica antienterotoxinas se situou nos 75.0% e que a percentagem nos portadores não atópicos foi de 50.0%. A comparação destas duas proporções revelou que a diferença é estatisticamente significativa ( $p = 0.001$ ) pelo que, tal como nos doentes, os portadores atópicos produzem mais IgE específica que os não atópicos.

Tabela 3.7 – Indivíduos atópicos e não atópicos produtores de IgE específicas anti-SE

Grupo		Doentes	Portadores de MRSA	Teste
Produtores de IgE específicas anti-SE				
Atópicos produtores de IgE específicas anti-SE	n %	5 45.5	6 75.0	$p = 0.198$
Não atópicos produtores de IgE específicas anti-SE	n %	5 13.9	6 50.0	<b><math>p = 0.010</math></b>
Teste		$p = 0.025$	$p = 0.001$	

Estes resultados vão de encontro ao que a Academia Europeia de Alergologia e Imunologia define como atopia “uma tendência pessoal ou familiar que leva à produção exagerada de IgE em resposta a baixas doses de alérgenos” (Johansson, *et al.*, 2001). Assim, indivíduos atópicos apresentam uma predisposição elevada para produzir IgE específica anti-SE, mesmo em respostas a baixas doses de alérgenos (toxina do *S. aureus*), o que, por sua vez, leva a um aumento da concentração de IgE total, desenvolvendo inflamação através da libertação de várias citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a severidade da doença. Contudo, a literatura refere que concentrações elevadas de IgE específica contra determinado alérgeno, nem sempre são sinónimo de sintomas ou de agravamento da doença, uma vez que, indivíduos com baixas concentrações de IgE específica podem apresentar risco de anafilaxia (Huss-Marp, *et al.*, 2011).

A comparação entre doentes e portadores revelou que apenas existe diferença significativa nos não atópicos ( $p = 0.010$ ), tendo sido a proporção dos indivíduos que produzem IgE específica anti-SE mais elevada nos profissionais de saúde. Este facto sugere que a produção de IgE específica não é dependente do fator atopia, pelo que indivíduos não

atópicos podem produzir IgE em resposta a determinado alérgeno. No entanto, para se desenvolver uma resposta imunitária mediada por IgE tem que existir uma forte estimulação antigénica.

### 3.7 Produção de toxinas e IgE específica anti-enterotoxinas em função do sexo, em doentes e profissionais de saúde

Os dados apresentados na Tabela 3.8 revelaram que, em 60% das mulheres do grupo dos doentes, as estirpes de *S. aureus* foram produtoras de toxinas, enquanto que a proporção nos homens foi de 88.9%. A diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0.021$ ) pelo que se pode afirmar que nos doentes do sexo masculino há mais produção de toxinas do que nos do sexo feminino.

Tabela 3.8 – *S. aureus* produtores de toxinas em função do sexo

Grupo		Doentes	Portadores de MRSA	Teste
<i>S. aureus</i> produtores de toxinas				
Mulheres	n %	12 60.0	10 66.7	p = 0.685
Homens	n %	24 88.9	3 60.0	
Teste		<b>p = 0.021</b>	p = 0.786	

No grupo dos portadores, a proporção de mulheres colonizadas por estirpes de *S. aureus* produtoras de toxinas foi de 66.7% e a proporção nos homens situou-se nos 60.0%. A diferença observada não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.786$ ).

A comparação entre os grupos revelou que as proporções são semelhantes, ou seja, quer nas mulheres, quer nos homens as diferenças na produção de toxinas não são estatisticamente significativas ( $p = 0.685$  e  $p = 0.102$ ).

Quanto à percentagem de mulheres e de homens produtores de IgE específica anti-SE (Tabela 3.9), os resultados mostraram que, nos doentes, a proporção de mulheres produtoras é de 20.0% e a dos homens de 22.2%, não sendo significativa a diferença entre

as duas ( $p = 0.855$ ) Nos portadores a percentagem de mulheres produtoras de IgE específica antienterotoxinas foi de 53.3%, enquanto que, nos homens 80.0% foram produtores. Tal como no grupo dos doentes, também neste grupo a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0.291$ ).

Tabela 3.9 - Produtores de IgE específica anti-SE em função do sexo

Grupo		Doentes	Portadores de MRSA	Teste
Produtores de IgE específicas anti-SE				
Mulheres	n %	4 20.0	8 53.3	$p = 0.040$
Homens	n %	6 22.2	4 80.0	<b><math>p = 0.010</math></b>
Teste		$p = 0.855$	$p = 0.291$	

Comparando as proporções de produtores de IgE específica entre os dois grupos, verificou-se que, quer nas mulheres, quer nos homens, os valores são mais elevados nos portadores. Em ambos os casos, as diferenças são estatisticamente significativas com  $p = 0.040$ , para as mulheres, e  $p = 0.010$ , para os homens.

Não existem estudos que definam claramente que o sexo influencia a produção de IgE. No entanto, Spalding *et al* (2000) verificou que as concentrações de IgE se encontravam mais elevadas nos indivíduos do sexo masculino, em qualquer faixa etária considerada. Contudo, sabe-se que os níveis de IgE tendem a baixar à medida que a idade avança como já foi referido anteriormente. Assim, esta pode ser a explicação para se encontrarem valores de IgE específica anti-SE mais elevados nos portadores de MRSA, do que nos doentes, uma vez que a idade média dos portadores é de 39 anos contra 75 anos dos doentes.



## **IV - Conclusão**

## 4.1 Conclusão

*S. aureus* metilicina resistente é considerado um problema emergente em todo o mundo, sendo responsável por inúmeras doenças, como as intoxicações alimentares, infecções de pele, endocardites, pneumonias, choque tóxico e algumas patologias autoimunes.

A sua patogenia deve-se à produção de inúmeros fatores de virulência, nomeadamente a cápsula, produção de coagulase, lipase, hialuronidase, proteína A e enterotoxinas estafilocócicas. Estas são uma grande família de proteínas altamente virulentas, com atividade de superantigénios. Outro fator de virulência problemático é a sua resistência a antimicrobianos, como os  $\beta$ -lactâmicos.

Neste sentido, a realização de rastreios hospitalares, é uma ferramenta importante na vigilância epidemiológica ativa de MRSA, na medida em que permite a identificação de doentes e portadores colonizados, permitindo adotar de imediato medidas de prevenção evitando assim, a disseminação e transmissão deste microrganismo, a outros doentes, profissionais de saúde e a outros indivíduos da comunidade. Assim, a realização destes estudos, ainda que acarretem alguns custos, são uma mais-valia, na redução das taxas de morbilidade e mortalidade associadas ao MRSA, dando um importante contributo na melhoria contínua da qualidade dos cuidados de saúde prestados.

Uma infeção por *S. aureus* é por si só grave. No entanto, pode agravar-se ainda mais se houver produção de toxinas estafilocócicas e consequentemente produção de anticorpos do tipo IgE contra essas toxinas.

Este trabalho permitiu avaliar e relacionar a produção toxinas do *S. aureus* e produção de IgE específica anti-SE em doentes com infeção por *S. aureus* atópicos e não atópicos e portadores atópicos e não atópicos.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a toxina produzida em maior quantidade nos doentes é a toxina C (61,7%) e nos portadores é a toxina A (35%), que pode sugerir que estirpes de *S. aureus* que produzem toxina C são mais virulentas, provocando infeções graves.

Em relação à concentração de IgE específica anti-SE verificou-se que, portadores de MRSA que produzem toxina A são também, produtores de IgE específica anti-SEA , o que indica uma sensibilização ao alérgeno (toxina A).

Conclui-se também, que no grupo dos portadores a produção de IgE específica anti-SE é mais elevada do que no grupo dos doentes, o que sugere que a produção de IgE é mais frequente em indivíduos mais jovens.

Ainda, relativamente à concentração de IgE específica anti-SE, concluiu-se que indivíduos não atópicos apresentam concentrações de IgE significativamente inferiores aos indivíduos atópicos, tanto no grupo dos doentes como nos portadores, o que confirma outros estudos já realizados. Assim, conclui-se que a atopia é um fator que predispõe para a produção de anticorpos do tipo IgE anti-SE.

## **V - Perspetivas Futuras**

## 5.1 Perspetivas Futuras

*S. aureus* é um microrganismo patogénico e cada vez possui mais mecanismos para escapar às defesas do hospedeiro. Assim, é extremamente difícil a sua erradicação.

Seria interessante, num estudo posterior determinar a prevalência de genes de *S. aureus* responsáveis pela produção de toxinas, caracterizando assim, as estirpes mais frequentes no Hospital Sousa Martins.

Seria importante também, repetir este trabalho após seis meses, com o intuito de verificar se os portadores já não apresentam colonização e se continuam ou não a produzir toxinas e IgE específica anti-SE e ainda, identificar novos portadores. Relativamente aos doentes, seria interessante identificar os portadores de MRSA na altura da admissão hospitalar.

## **VI - Bibliografia**

Aalberse, R. C. (2000). Specific IgE and IgG responses in atopic versus nonatopic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 124-127.

Ahlstedt, S. (2002). Understanding the usefulness of specific IgE blood tests in allergy. *Clin Exp All* 32, 11-16.

Al-Wali, W., Elvin, S., Mason, C., Clark, A. e Tranter, H. (1998). Comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from line and non-line associated septicemia, CAPD peritonitis, bone/joint infections and healthy nasal carriers *J Med Microbiol* 47, 265-274.

Bachert, C. (2007). Staphylococcal superantigen effects, their impact and diagnosis. *Chem Immunol Allergy* 2, 1-6.

Bachert, C., Gevaert, P. e Cauwenberge, P. V. (2002). *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy, Asthma and Immunol* 57, 480-487.

Barbier, F., Ruppé, E. e Hernandez, D. (2010). Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec between *Staphylococcus epidermidis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 202, 270-281.

Becker, K., Friedrich, A. W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G. e Eiff, C. v. (2003). Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens *J Clin Microbiol* 41, 1434-1439.

Bodtger, U., Poulsen, L. e Linneberg, A. (2006). Rhinitis symptoms and IgE sensitization as risk factors for development of later allergic rhinitis in adults. *Allergy* 61, 712-6.

Borrego, J. T., Terán, A. B. M. e Mendoza, C. M. (2008). Prevalence and associated factors of allergic rhinitis and atopic dermatitis in children. *Allergol Immunopathol* 36, 90-100.

Breuer, K., Kapp, A. e Werfel, T. (2001). Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy* 56, 1034-1041.

- Bunikowski, R., Mielke, M., Skarabis, H. e Herz, U. (1998). Prevalence and role of serum IgE antibodies to the Staphylococcus aureus-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 103, 119-124.
- Cenci-Goga, B., Karama, M., Rossitto, P., Morgante, R. e Cullor, J. (2003). Enterotoxin production by Staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. *J. Food Protection* 66, 1693-1696.
- Chen, W.-T., Wang, J.-T., Lee, W.-S., Huang, C.-H., Liao, C.-H., Chen, Y.-C. e Chang, S.-C. (2010). Performance of the BD GeneOhm methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) PCR assay for Detecting MRSA nasal colonization in Taiwanese Adults. *J Microbiol Immunol Infect* 43, 372-377.
- Couto, R. C., Pedrosa, T. M. G., Cunha, A. F. A. e Amaral, D. B. d. (2009). Bactérias Multiresistentes. In *Infeção Hospitalar e outras complicaçõesz não-infeciosas da doença*, (editora G. Koogan), pp. 497-514.
- Cristino, M. (2000). Sthphylococcus. In *Microbiologia*, vol. 2 (editora Lidel), pp. 239-249.
- Croes, S., Deurenberg, R., Boumans, M. L. e Beisser, P. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC Microbiol* 9, 1-9.
- Davies, J. M. e O'Hehir, R. E. (2008). Immunogenetic characteristics of immunoglobulin E in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 38, 566-578.
- Davis, J. (2005). Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus* *Int Med J* 35, 79-96.
- DeVries, A., Leshner, L., Schlievert, P. M., Rogers, T., Villaume, L., Danila, R. e Lynfield, R. (2011). Staphylococcal Toxic Shock Syndrome 200-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. *Plos one* 6, 1371-1379.
- Dinges, M., Orwin, P. e Schlievert, M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34.



EARSS. (2008). European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Eur Centre for Disease Prevention and Control*, 55-57.

Eiff, C. v., Becker, K., Machka, K. e Stammer, H. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 344, 11-16.

Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. F. d. (2000). Staphylococcus. In *Microbiologia*, vol. 2 (editora Lidel), pp. 39-48. Lisboa.

Foreman, A., Holtappels, G., Psaltis, A. e Jervis-Bardy, J. (2011). Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 66, 1449-1456.

Foster, T. J. (2004). The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Invest* 114, 1693-1696.

Host, A., Andrae, S., Charki, S., Diaz-Vázquez, C., Dreborg, S., P Eigenmann, Friadrichs, F., Grinsted, P. e Lack, G. (2003). Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy, Asthma and Immunol* 58, 559-569.

Hu, D.-L., Maina, E. K., Omoe, K., Inoue, F., Yasujima, M. e Nakame, A. (2011). Superantigenic toxin genes coexist with specific *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 225, 161-169.

Huss-Marp, J., Darson, U., Brockow, K., Pfab, F., Weichenmeier, I. e Schober, W. (2011). Can immunoglobulin E-measurement replace challenge tests in allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen? *Clin Exp Allergy* 41, 1116-24.

Iniguez, M. e Fonseca, X. (2006). Role of the superantigens in the etiopathogeny of chronic polypous rhinosinusitis. In *Rev Otorrinolaringol*, vol. 1, pp. 66-74.

INVS. (2006). Enquête nationale de prevalence des infections nosocomiales, vol. 1. France.

Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J. e Lina, G. (1999). Involvement of enterotoxin G and I in *Staphylococcal* Toxic Shock Syndrome and *Staphylococcal* Scarlet Fever. *J Clin Microbiol* 37, 2446-2449.

Jawetz, E., Melnick eAdelberg. (2007). Staphylococci. In *Lange Medical Microbiology*, (editora T. M. H. Companies), pp. 347-357.

Johansson, S., Hourihane, J. O. B., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C. e Dreborg, S. (2001). A revised nomenclature for allergy. *Allergy, Asthma and Immunol* 56, 813-824.

Kanafani, Z. e Vance, F. (2006). Staphylococcus aureus Infections: New Challenges from an Old Pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24, 182-193.

Kisich, K., Carspecken, C. e Fiéve, S. (2008). Defective killing of Staphylococcus aureus in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta defensin-3. *J Allergy Clin Immunol* 122, 62-68.

Kissner, T., Cisney, E., Ulrich, R., Fernandez, S. e Saikh, K. (2010). Staphylococcal enterotoxin A induction of proinflammatory cytokines and lethality in mice is primarily dependent on MyD88. *Immunology* 130, 516-526.

Kluytmans-Vandenbergh, M. e Kluytmans, J. (2006). Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: current perspectives. *Clin Microbiol Infect* 12, 9-15.

Kowalski, M., Cieslak, M. e Pérez-Novo, C. (2011a). Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies. *Allergy* 66, 32-38.

Kowalski, M., Cieslak, M., Pérez-Novo, C., Makowska, J. e Bachert, C. (2011b). Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies. *Allergy, Asthma and Immunol* 66, 32-38.

Kuby, J., Goldsby, R., Kindt, R. e Osborne, T. (2003). Hypersensitivity-Allergy. In *Immunology*, (editora F. A. Company).

Lamy, B., Laurent, F., Gallon, O., Doucet-Populaire, F., Etienne, J. e Decousser, J. (2011). Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among Staphylococcus aureus isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10, 1441-1445.

Larkin, E., Krakauer, T. e Ulrich, R. (2010a). Staphylococcal and Streptococcal Superantigens: Basic Biology of Conserved Protein Toxins. *The Open Toxinol Journal* 3, 69-81.

Larkin, E., Krakauer, T., Ulrich, R. e Stiles, B. (2010b). Staphylococcal and Streptococcal superantigens: Basic biology of conserved protein toxins. *Toxiology J* 3, 69-81.

Laupland, K., Ross, T. e Gregson, D. (2008). Staphylococcus aureus bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J Infect Dis* 198, 336-343.

Lee, A., Huttner, B. e Harbarth, S. (2011). Control of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Dis Clin N Am* 25, 155-179.

Levinson, W. (2008). Antibodies. In *Lange Microbiology and Immunology Review*, vol. 1 (editora T. M.-H. Companies), pp. 534-549.

Liu, X., Wang, G., Hong, X., Wang, D., Tsai, H., Zhang, S., Arguelles, L., Kumar, R. e Wang, H. (2011). Gene-vitamin D interactions on food sensitization: a prospective birth cohort study. *Allergy* 66, 1442-1448.

Loir, Y. L., Baron, F. e Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res* 2, 63-76.

Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England J. Medicine*, 520-532.

Macias, E., Pereira, F., Rietkerk, W. e Safai, B. (2010). Superantigens in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 64, 455-472.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. e Clark, D. (2009). Bacteria: Gram-Positive and Other Bacteria. In *Biology of Microorganisms*, (editora P. Educations), pp. 446-447.

Mahon, C., Lehman, D. e Manuselis, G. (2007). Host-Pathogen Interaction. In *Diagnostic Microbiology*, (editora Elsevier), pp. 30.

Maroco, J. (2007). Análise Estatística. In *Análise Estatística - Com utilização do SPSS*, (editora M. Robalo).

Monnet, D., MacKenzie, F., Lopez-Lozano, J., Beyaert, A., Camacho, M., M Wilson, Stuart, D. e 2004, I. G. (2004). Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 10, 1432-1441.

Moura, J., Pimenta, F., Hayashida, M., Cruz, E. A., Canini, S. e Gir, E. (2011). Colonization of Nursing Professionals by *Staphylococcus aureus*. *Rev Latino-Am Enfermagem* 19, 325-331.

Murray, P. (2006). *Staphylococcus and Micrococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, vol. 1 (editora A. S. f. Microbiology), pp. 384-397.

Murray, P., Rosenthal, K. e Pfauer, M. (2007). *Staphylococcus y Micro-organismos relacionados*. In *Microbiologia Médica*, (editora Elsevier), pp. 221-236.

Nabera, C. K. (2009). *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clin Infec Dis* 48, 231-7.

Núñez, I., Peña, J. K., Quintana, M. E., Suárez, N., Vazquez, G., Velazco, R. e Marcano-Lozada, M. J. (2008). *Staphylococcus aureus y alergias: Mito o realidad?* In *Academia Biomédica Digital*, vol. 34, pp. 1-15. Venezuela: VITAE.

Ogston, A. (1882). Micrococcus poisoning. *J Anatomy* 17, 24-58.

Olaechea, P., Insausti, J., Blanco, A. e Luque, P. (2010). Epidemiología e impacto de las infecciones nasocomiales. *Med Intensiva* 34, 256-267.

Ong, P. Y., Patel, M., Ferdman, R., Dunaway, T. e Church, J. (2008). Association os staphylococcal superantigen-specific IgE with mild and moderate atopic dermatitis. *J Pediatr* 153, 803-806.

Pádua, M. (2009). Staphylococcaceae. In *Patologia Clínica para Técnicos*, vol. 1 (editora Lusociência), pp. 147-152.

Paganelli, R., Ansotegui, I., Sastre, J., Lange, C. e Roovers, M. (1998). Specific IgE antibodies in the diagnosis of atopic disease. *Allergy* 53, 763-768.

Parsonnet, J., Hansmann, M., Seymour, J., Delaney, M., Dubois, A., Modern, P., Jones, M., Wild, J. e Onderdonk, A. (2010). Persistence survey of toxic shock syndrome toxin-1 producing *Staphylococcus aureus* and serum antibodies to this superantigen in five groups of menstruating women. *BMC Infectious Diseases* 10, 1-8.

Pasternak, J. (2009). Biofilmes: um inimigo (in)visível. *SBCC*, 36-38.

Paule, S., Hacek, D., Kufner, B., Truchon, K., Thomson, R., Robicsek, A. e Peterson, L. (2007). Performance of the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Test before and during High-Volume Clinical Use. *J Clin Microbiol* 45, 2993-2998.

Pestana, M. H. e Gageiro, J. N. (2005). SPSS. In *Análise de dados para ciências sociais - A complementaridade do SPSS* (editora E. Sílabo).

Pinchuk, I. V., Beswick, E. J. e Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins. *J Toxins* 2, 2177-2197.

PNCI. (2004). Prevenção de infecções adquiridas no hospital. *INSA* 2, 28-36.

Qian, Z., Yin, Y., Zhang, Y., Lu, L., Li, Y. e Jiang, Y. (2006). Genomic characterization of ribitol teichoic acid synthesis in *Staphylococcus aureus*: genes, genomic organization and gene duplication. *BMC Genomics* 5, 74-89.

Qu, F., Cui, E., Guo, T., Li, H., Chen, S., Liu, L., Han, W., Bao, C., Mao, Y. e Tang, Y.-W. (2010). Nasal colonization of and clonal transmission of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* among chinese military volunteers. *J Clin Microbiol* 48, 64-69.

Roitt, I., Brostoff, J. e Male, D. (2003a). Hipersensibilidade. In *Imunologia*, vol. 1 (editora Manole), pp. 323-343.

Roitt, I., Brostoff, J. e Male, D. (2003b). Introdução ao Sistema Imune. In *Imunologia*, vol. 1 (editora Manole), pp. 1-13.

Santos, c. L. d., Santos, D. O., Freitas, C. C. d., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R. e Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. *J Bras Patol Med Lab* 43, 413-423.

Schaechter, M. (2009). Staphylococcus. In *Encyclopedia of Microbiology*, pp. 909-920: Elsevier.

Schilevert, P. M., Case, L. C., Strandberg, K. L., Abrams, B. B. e Leung, D. Y. M. (2008). Superantigen Profile of Staphylococcus aureus isolates from patients with steroid-resistance atopic dermatitis. *Clin Infect Dis* 46, 1562-1567.

Silva, C. H. e Neufeld, P. M. (2006). *Staphylococcus*. In *Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico*, (editora Revinter), pp. 223-228.

Tang, Y.-W. e Stratton, C. W. (2010). *Staphylococcus aureus*: an old pathogen with new weapons. *Clin Lab Med* 30, 179-208.

Thammavongsa, V., Kern, J. W., Missiakas, D. e Schneewind, O. (2009). Staphylococcus aureus synthesizes adenosine to escape host immune response. *J Exp Med* 28, 2417-2427.

Todd, J. e Fishaut, M. (1978). Toxic shock syndrome associated with phage-group1 staphylococci. *Lancet* 2, 1116-1118.

Tortora, G. J., Funke, B. R. e Case, C. L. (2010). Microbial of Disease of the skin and eye. In *Microbiology an Introduction*, (editora P. Education), pp. 584-591.

Verkaik, N. J., Vogel, C. P. d., Boelens, H. A. e Grumann, D. (2009). Anti-Staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 199, 625-632.

Walker, J., Hoffman, P., Bennet, A., Vos, M., Thomas, M. e Tomlinson, N. (2007). Hospital and community acquired infection and the built environment - design and testing of infection control rooms. *J Hospital Infect* 65, 43-49.

Wood, R., Segall, N., Ahlstedt, S. e Williams, P. (2007). Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 99, 34-41.

Wu, S., Zhang, R., Huang, D., Geng, Y., Gao, S., Li, X. e Hu, Z. (2010). Immune reaction characteristics an the mechanism of anergy induced by recombinant enterotoxin A of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Sci Engineering* 3, 543-549.

Zheng, T., Yu, J., Oh, M. H. e Zhu, Z. (2011). The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 3, 67-73.

Zollner, T., Wichelhaus, T., Hartung, A., Mallinckrodt, C. v., Wagner, T., Brade, V. e Kaufmann, R. (2000). Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 30, 994-1000.